

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis

Suedali Villas Bôas Coelho Barata

**OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR AGREGADO POR ROTA
BIOTECNOLÓGICA UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS**

Diamantina

2019

Suedali Villas Bôas Coelho Barata

**OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR AGREGADO POR ROTA
BIOTECNOLÓGICA UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales
do Jequitinhonha e Mucuri na área de Biotecnologia
como requisito para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Dr^a. Ana Paula de Figueiredo Conte
Vanzela

Diamantina

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B226o Barata, Suedali Villas Boas Coelho
Obtenção de produtos de alto valor agregado por rota biotecnológica
utilizando fungos filamentosos / Suedali Villas Boas Coelho Barata,
2019.
144p. : il.

Orientadora: Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis)
- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
Diamantina, 2019.

1. *Aspergillus tubingensis*. 2. *Fusarium*. 3. Glicerol.
3. L-asparaginase. 4. Ácido málico. I. Vanzela, Ana Paula de
Figueiredo Conte. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 660.6

SUEDALI VILLAS BÔAS COELHO BARATA


Título da defesa: Obtenção de produtos de alto valor agregado por rota Biotecnológica utilizando fungos filamentosos

Tese apresentada ao DOUTORADO
EM BIOCOMBUSTÍVEIS, nível de
DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Ana Paula
De Figueiredo Conte

Data da aprovação : 17/12/2019


Prof.Dr.ª ANA PAULA DE FIGUEIREDO CONTE VANZÊLA - UFVJM


Prof.Dr.ª VALÉRIA MACEDO CARDOSO - UFVJM


Prof.Dr. RICARDO SALVIANO DOS SANTOS - UFVJM


Prof.Dr. EMERSON DELANO LOPES - FNMG


Prof.Dr.ª SÔNIA RIBEIRO ARRUDAS - UNIMONTES

DIAMANTINA

*Dedico essa Tese ao meu marido Ricardo, aos meus filhos Isabela e Pedro e aos meus pais
Sueli e Dalton (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre estar presente na minha vida, meu fiel companheiro.

Aos meus filhos Isabela e Pedro, que eram tão pequenos quando isso tudo começou e sem saber me deram força, para continuar quando eu mais precisava. Mamãe ama muito vocês, sou eternamente grata de tê-los.

A minha amada mãezinha, por sempre me incentivar a continuar, mesmo com tantos percalços pelo caminho. Seus conselhos de não desistir me levaram a chegar até aqui. Te amo!

Ao meu saudoso pai, que se tornou luz e força para mim quando virou uma estrela. Sei que você cuida de mim daí de cima e está feliz por mais essa vitória.

Ao meu amado Richard, que segurou as pontas quando precisei me ausentar para fazer essa Tese acontecer, se dedicando aos nossos filhos e por contribuir nas correções da mesma. Te amo muito!

À minha orientadora Ana Paula, que é um exemplo de pesquisadora e professora, além de uma mulher humana e inteligente, que me ensinou que o conhecimento deve ser passado com carinho e humildade e não guardado para si.

Aos meus irmãos e cunhados: Suzana, Gabriel, Júnior, Sueli e aos meus amados sobrinhos: Bê e Laurinha, por sempre torcerem por mim. Amo fazer parte da nossa família.

A família Barata: Tio Beto, D. Vera, Nado, Guiga, Tati, Robertinho, Rê e aos meus amados sobrinhos: Mari, João, Lipe e Nina, por me acolherem e torcerem para que tudo desse certo.

Aos meus queridos amigos: Mandinha, Cris e Ti Gu, Jack e Tony, Ana Paula Rodrigues e Gustavo Bahia, Rúbia e Disney, Lorena e Fábio, por deixarem meus finais de semana mais leves e felizes.

À Nahyara, que me ensinou e me ajudou muito sobre a prática com os fungos, amiga e companheira do dia a dia, dos sábados e feriados no laboratório. Meu muito obrigado por você compartilhar comigo tudo o que sabia.

Ao Tiago, meu amigo sempre disponível e pronto a ajudar. Até morando em Ouro Branco por telefone já me aconselhava. Você faz parte dessa história, desses experimentos, desse trabalho. Meu muito obrigado, pelas honrosas contribuições.

A Carol, amiga de laboratório e da vida. Muito obrigada pelas conversas, risadas e contribuições nesse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos: Jorge e Aline, agradeço pelos ensinamentos, a ajuda que se dispuseram e as boas risadas.

A todos os amigos da Pós-Graduação em Biocombustíveis, que compartilharam suas histórias e desafios comigo.

A todos os pesquisadores que colaboraram para que essa Tese fosse concluída: João Paulo Mesquita (LIPEMVALE), Alexandre Soares dos Santos (Biocombustíveis), Guilherme Lage (Química), Wallans Torres (Farmácia) e Rodiney (UFMG).

À Pós-Graduação em Biocombustíveis e ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, por contribuírem para que esse trabalho fosse realizado.

Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco sei, ou nada sei...

Almir Sater e Renato Teixeira

RESUMO

Buscando uma solução para a problemática do descarte de glicerol, um coproduto do biodiesel na natureza, diversas pesquisas estão sendo realizadas, a fim de viabilizar seu uso como matéria-prima alternativa para a obtenção de produtos industriais. O uso de glicerol como fonte de carbono para os fungos filamentosos é de grande interesse para a obtenção de produtos de alto valor agregado como os ácidos orgânicos e enzimas. Dessa forma, para estimular a produção de ácidos orgânicos e L-asparaginase no Brasil, desenvolvendo processos produtivos biotecnológicos viáveis, uma das premissas é estabelecer a produção a partir de substratos alternativos. Os ácidos orgânicos são substâncias que servem como acidulantes e contribuem com a cor, aroma e gosto de bebidas e outros alimentos, bem como são utilizados em alguns medicamentos. Já a L-asparaginase é uma enzima que catalisa a reação de degradação da L-asparagina em L-aspartato e amônia. É uma enzima utilizada na indústria alimentícia para evitar a formação de acrilamida nos alimentos. Na indústria farmacêutica é aplicada como agente terapêutico para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda. O objetivo desse trabalho foi verificar o potencial das linhagens *Aspergillus tubingensis* AN1257 e *Aspergillus niger* 10v10 para a conversão de glicerol a ácidos orgânicos e de *Fusarium* sp. T22.2 para a conversão de glicerol a L-asparaginase. A secreção de ácidos pelas linhagens acima citadas foi avaliada em meio sólido, variando-se a fonte de carbono (glicerol ou sacarose) e o pH. *Aspergillus tubingensis* AN1257 apresentou boa acidogênese em pH 4, em meio suplementado com sacarose ou glicerol. O cultivo de AN1257 foi conduzido também em bioprocessos submersos, sendo a secreção de ácidos evidenciados pela diminuição progressiva do pH, conforme determinado por titulometria. A análise dos filtrados por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou que AN1257 produziu 13,6 g. L⁻¹ de ácido málico nos processos submersos suplementados com sacarose. A produção desse ácido orgânico por rota biotecnológica abre perspectiva para o desenvolvimento de processos mais viáveis economicamente do que a produção atual, baseada na obtenção a partir do petróleo. Outros ácidos de elevado valor agregado também foram produzidos em menor quantidade. *Fusarium* sp. T22.2 produziu elevada atividade de L-asparaginase em meio líquido suplementado com glicerol e em pH 6. Os resultados obtidos confirmam o valor das linhagens estudadas para o desenvolvimento de processos biotecnológicos com a finalidade de obter substâncias de alto valor agregado a partir da bioconversão de glicerol e sacarose.

Palavras-chave: *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium*, Glicerol, L-asparaginase, Ácido málico

ABSTRACT

In search for a solution for the problem of discarding glycerol a coproduct of biodiesel in the nature, several researches have been conducted, aiming to turn viable its use as alternative raw substrate for obtaining industrial products. The use of glycerol as carbon source by filamentous fungi is of great interest for obtaining high-value-added products like organic acids and enzymes. In this sense, to stimulate the production of organic acids and L-asparaginase in Brazil, by developing viable productive biotechnological processes, one of the premises is to establish the production from alternative substrates. Organic acids are substances used as acidifiers and contribute to color, aroma and taste of beverages. L-asparaginase is an enzyme which catalyzes the reaction of degradation of L-asparagine in L-aspartate and ammonia. It is an enzyme used in the food industry to avoid formation of acrylamide in foods. In the pharmaceutical industry it is produced as a therapeutic to treat acute lymphoblastic leukemia. The objective of this work was to verify the potential of *Aspergillus tubingensis* AN1257 and *Aspergillus niger* 10v10 for the bioconversion of glycerol to organic acids and of *Fusarium* sp. T22.2 for bioconversion of glycerol to L-asparaginase. Secretion of acid by strains AN1257 and 10v10 was evaluated in solid media, varying the carbon source (glycerol or sucrose) and pH. Strain AN1257 presented good acidogenesis at pH 4, in media supplemented with either sucrose or glycerol. Cultivation of strain AN1257 was also conducted in submerged bioprocesses, whereas acid secretion was evidenced by progressive decreasing of pH, as determined by titration. Analysis of filtrates by high performance liquid chromatography showed that strain AN1257 produced 13.6 g . L⁻¹ of malic acid in submerged processes supplemented with sucrose. Production of this organic acid by biotechnological route opens the perspective for processes economically more viable than the current production, which is based in obtaining from petroleum. *Fusarium* sp. T22.2 produced elevated activity of L-asparaginase in liquid media supplemented with glycerol at pH 6. Results obtained confirm the value of the studied strains to develop biotechnological processes aiming to obtain substances of high-added valued by means of bioconversion of glycerol and sucrose.

Keywords: *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium*, glycerol, L-asparaginase, Malic acid

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Morfologia dos conidióforos de <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257.....	33
Figura 2 - Macroconídio de <i>Fusarium avenaceum</i> (7), Microconídio de <i>Fusarium moniliforme</i> (9) e Clamidósporos de <i>Fusarium solani</i> (12).....	36
Figura 3 - Porcentagem mundial do uso de glicerol.....	39
Figura 4 - <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 (A), <i>Fusarium</i> sp. T22.2 (B) e <i>Aspergillus niger</i> 10v10 (C).....	50
Figura 5 - Esporos de <i>Fusarium</i> sp. T22.2.....	51
Figura 6 - Bioprocessos submersos conduzidos com <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257.....	54
Figura 7 - Bioprocessos estacionários conduzidos com <i>Fusarium</i> sp. T22.2.....	57
Figura 8 - Cultivo de <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 e <i>Aspergillus niger</i> 10v10 para avaliação da acidogênese em meio sólido suplementado com sacarose e glicerol em pH 4.....	61
Figura 9 - Crescimento e índice de acidogênese de <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 e <i>Aspergillus niger</i> 10v10 em meios ajustados para pH 4.....	62
Figura 10 - Comparação da acidogênese produzida por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 e <i>Aspergillus niger</i> 10v10 em função da fonte de carbono em meio ajustado para pH 6.....	63
Figura 11 - Crescimento e índice de acidogênese de <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 e <i>Aspergillus niger</i> 10v10 em meios ajustados para pH 6.....	64
Figura 12 - Produção de ácidos totais por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 em processo submerso em função da fonte de carbono e pH ácido.....	66
Figura 13 - Produção de ácidos totais por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 em processo submerso em função da concentração de sacarose em pH próximo à neutralidade.....	68
Figura 14 - Quantificação dos ácidos totais produzidos por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 em processo submerso em função da concentração de sacarose e do pH.....	70
Figura 15 - Análise por HPLC para identificação dos ácidos orgânicos produzidos por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 em processo submerso suplementado com sacarose em pH 5,5.....	72

Figura 16 - Análise por HPLC e identificação de glicose e frutose em amostra de cultura de <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 em processo submerso suplementado com sacarose.....	73
Figura 17 - Análise por HPLC e identificação de glicerol em amostra de cultura submersa de <i>Aspergillus tubingensis</i>.....	74
Figura 18 - Análise por HPLC e identificação de ácidos orgânicos produzidos por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 em processo submerso suplementado com sacarose em pH 7,0.....	75
Figura 19 - Análise por HPLC evidenciando um pico desconhecido.....	79
Figura 20 - Análise por ESims para detecção de substância desconhecida produzida por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257.....	80
Figura 21 - Análise por CG-MS para detecção de substância desconhecida produzida por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257.....	81
Figura 22 - Efeito estatístico das variáveis pH e concentração de sacarose sobre a produção de ácido málico por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257.....	82
Figura 23 - Potenciais vias metabólicas para a obtenção de ácidos orgânicos.....	84
Figura 24 - Efeitos da concentração de glicerol, L-asparagina e do pH sobre a produção de L-asparaginase por <i>Fusarium</i> sp. T22.2 após 72 horas de cultivo.....	89
Figura 25 - Efeitos da concentração de glicerol, L-asparagina e do pH sobre a produção de L-asparaginase por <i>Fusarium</i> sp. T22.2 após 96 horas de cultivo.....	90
Figura 26 - Efeitos da concentração de glicerol, L-asparagina e do pH sobre a produção de L-asparaginase por <i>Fusarium</i> sp. T22.2 após 120 horas de cultivo.....	91
Figura 27 - Produção de L-asparaginase por <i>Fusarium</i> sp. T22.2 em bioprocessos melhorados.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bioprocessos delineados por desenho composto central para produção de ácidos orgânicos	53
Tabela 2 - Bioprocessos delineados por planejamento fatorial para a produção de L-asparaginase.....	57
Tabela 3 - Produção de ácidos orgânicos por <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 em processos submersos delineados por desenho composto central suplementados com sacarose.....	76
Tabela 4 - Produção de L-asparaginase por <i>Fusarium</i> sp. T22.2 em bioprocessos delineados por planejamento fatorial.....	87
Tabela 5 - Avaliação da produção de L-glutaminase por <i>Fusarium</i> sp. T22.2.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. niger</i> 10v10	<i>Aspergillus niger</i> 10v10
<i>A. tubingensis</i> AN1257	<i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257
B.O.D.	Demanda bioquímica de oxigênio
CAGR	Taxa de crescimento anual
CG-Ms	Cromatografia gasosa – Massa
C	Carbono
DCC	Desenho composto central
<i>et al.</i>	e outros (do latim <i>Et alii</i>)
EUA	Estados Unidos das Américas
ESims	Eletrospray de alta resolução
FDA	Food and Drug Administration
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. T22.2
FES	Fermentação em Estado Sólido
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IA	Índice de acidogênese
IU	Unidade Internacional de atividade Enzimática
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Bibásico
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amônio
PEG	<i>E. coli</i> conjugada com polietileno-glicol
PDA	Ágar batata dextrosado
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium DodecylSulfate</i>)
sp.	espécie

T0	Tempo 0 minutos de reação
T30	Tempo 30 minutos de reação
TCA	Ácido tricloroacético
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Tris. HCl	Tris Hydrochloride
U/mL	Unidades por mililitro
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
<	menor
$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$	Micromolar por minute por mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
atm	Pressão atmosférica
g	Unidade de força centrífuga
n	número de variáveis estudadas
M	Molar
min	Minutos
mM	Milimolar
μM	Micromolar
mL^{-1}	Mililitro
g L^{-1}	Gramas por litro
mol L^{-1}	Molaridade por litro
G	Aceleração da gravidade
h	Horas
M	Molar
L	Litro
mL/min	Mililitro por minuto
μL	Micro litro
nm	Nanômetro
N	Normalidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	26
2.1 Fungos filamentosos: características e aplicação biotecnológica.....	26
2.1.1 O gênero <i>Aspergillus</i> e a espécie <i>A. tubingensis</i>	31
2.1.2 Gênero <i>Fusarium</i>	35
2.2 Glicerol: um coproduto do biodiesel que pode ser transformado em produtos de alto valor agregado.....	37
2.3 Ácidos orgânicos.....	40
2.4 A enzima L-asparaginase.....	42
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivo geral.....	48
3.2 Objetivos específicos.....	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Linhagens e Manutenção.....	50
4.2 Preparo de inóculo.....	51
4.3 Conversão de glicerol e sacarose a ácidos orgânicos.....	52
4.3.1 Triagem da produção de ácidos orgânicos em meio sólido.....	52
4.3.2 Produção de ácidos orgânicos por processo submerso.....	52
4.3.3 Análise titulométrica.....	55
4.3.4 Determinação, quantificação e análise dos ácidos orgânicos produzidos por <i>A. tubingensis</i> AN1257.....	55
4.4 Conversão de glicerol a L-asparaginase.....	56
4.4.1 Produção de L-asparaginase por processo estacionário em estado líquido.....	56
4.4.2 Melhoramento da produção de L-asparaginase.....	57
4.4.3 Verificação da produção de atividade de L-glutaminase.....	58
4.4.4 Determinação da atividade de L-asparaginase e L-glutaminase.....	58

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Conversão de glicerol e sacarose a ácidos orgânicos.....	60
<i>5.1.1 Triagem da produção de ácidos orgânicos em meio sólido.....</i>	<i>60</i>
<i>5.1.2 Produção de ácidos orgânicos por processo submerso.....</i>	<i>66</i>
<i>5.1.3 Determinação, quantificação e análise dos ácidos orgânicos produzidos por Aspergillus tubingensis AN1257.....</i>	<i>71</i>
5.2 Conversão de glicerol a L-asparaginase.....	87
<i>5.2.1 Melhoramento da produção de L-asparaginase.....</i>	<i>92</i>
<i>5.2.2 Verificação da produção de atividade de L-glutaminase.....</i>	<i>94</i>
 6 CONCLUSÃO.....	 96
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 98
 8 APÊNDICE.....	 110
8.1 ARTIGOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS.....	110
8.1.1 Artigo I.....	110
8.1.2 Artigo II.....	134

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a crescente preocupação com o esgotamento das fontes fósseis e seus impactos ambientais tem impulsionado as pesquisas relacionadas à obtenção de combustíveis a partir de recursos renováveis (NIGAM; SINGH, 2011). Mas, esse avanço da ciência também nos traz um dilema: pela produção e síntese industrial de novos e diversos compostos, novos resíduos também são introduzidos no ambiente. Muitas vezes, os mesmos são dificilmente degradados ou reciclados na forma em que se encontram e, assim, persistem frequentemente prejudicando a biota local e o próprio homem.

Dentre as várias tecnologias sustentáveis estudadas nas últimas décadas, têm-se aquelas que fazem uso de óleos vegetais ou animais para a produção de biodiesel e que fornecem glicerol como um coproduto produzido em larga escala. Na busca de uma solução para a problemática do descarte de glicerol na natureza, diversas pesquisas estão sendo realizadas, a fim de viabilizar seu uso como matéria-prima alternativa para a obtenção de produtos industriais. O uso de glicerol como substrato e fonte de carbono para o metabolismo de fungos filamentosos é uma alternativa para obtenção de produtos de alto valor agregado como os ácidos orgânicos e enzimas, contribuindo para a diminuição dos custos de produção.

Atualmente, a obtenção de ácidos orgânicos, que são utilizados como aditivos alimentares é realizada em escala industrial por via fermentativa. Alguns ácidos orgânicos têm importância na indústria alimentícia, como é o caso do ácido cítrico que possui sabor agradável, é facilmente assimilável pelo organismo humano e de baixa toxicidade. Devido a estas características, é amplamente utilizado como: acidulante, intensificador de sabor, antioxidante, inibidor da formação de ranço em óleos e gorduras, agente tamponante em geléias e gelatinas, e estabilizante (DEMAIN, 2000). Outro ácido de importância alimentar é o ácido glucônico, amplamente utilizado na indústria de laticínios e na fabricação de bebidas para prevenir a formação de precipitados indesejáveis, bem como na produção de diversos alimentos para realçar o sabor e complexar traços de metais pesados (CARVALHO *et al.*, 2005). E por fim, existem também os ácidos orgânicos málico, fumárico e succínico, que contribuem para melhorar aromas e gostos em bebidas.

Por outro lado, a L-asparaginase é uma enzima de amplo interesse nas indústrias farmacêuticas devido à sua ação terapêutica. Essa enzima catalisa a reação de degradação de L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia, resultando na redução da concentração plasmática de asparagina, com consequente inibição da síntese protéica, parada do ciclo celular na fase G1 e apoptose em células leucêmicas (SHANTHIPRIYA *et al.*, 2015). As células normais expressam a enzima L-asparagina sintetase e, assim, conseguem produzir

doses pequenas deste aminoácido (GRAHAM, 2003; MÜLLER; BOOS, 1998; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Segundo Lanvers-Kaminsk (2017) a L-asparaginase é licenciada para administração intravenosa e intramuscular e é empregada em esquemas quimioterápicos combinados com alguns outros agentes, como metotrexato, vincristina e prednisona para o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2016) a LLA é a neoplasia mais comum, especialmente em crianças abaixo dos 5 anos, representando cerca de 80% de todas as leucemias nessa faixa etária, portanto necessita-se investir em pesquisas na produção desta enzima no país.

Contudo, nos processos produtivos, o grande desafio é a busca pelas linhagens produtoras mais adequadas, capazes de realizar a bioconversão e acumular o produto de interesse, visto que o metabolismo e as milhares de reações bioquímicas que o compõem são estritamente regulados. Os mecanismos de regulação bioquímica e genética constituem-se em obstáculos para o acúmulo de intermediários metabólicos, sejam de natureza protéica ou não. Estes mecanismos regulatórios podem variar entre as linhagens de uma mesma espécie, fazendo com que a triagem por micro-organismos eficientes no uso de determinadas fontes de carbono e na sua conversão a um produto final desejado, seja um dos pontos fundamentais para o desenvolvimento de um processo produtivo. Por outro lado, o pH, a transferência de massa, calor e oxigênio no sistema, além das condições nutricionais, incluindo-se as fontes de carbono e nitrogênio e a relação entre elas influenciarão a morfologia, o crescimento e a produção de ácidos e enzimas, de modo que pelo ajuste destas condições é possível melhorar um processo produtivo.

Assim contextualizado, no presente trabalho foi investigada a adequação de linhagens dos fungos filamentosos AN1257 e 10v10 para a bioconversão de glicerol, como substrato alternativo, e de sacarose, um substrato convencional, a ácidos orgânicos e à enzima terapêutica L-asparaginase.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos filamentosos: características e aplicação biotecnológica

Os fungos são organismos extremamente importantes para o funcionamento dos ecossistemas e possuem impacto direto sobre diversas atividades humanas, sobretudo do ponto de vista clínico e biotecnológico, além do ambiental (BURKI, 2014; CAVALIER-SMITH, 2004; WOESE *et al.*, 1990). Estimativas apontavam uma diversidade de espécies fúngicas entre 3,5 a 5,1 milhões, das quais menos de 3% são conhecidas. Outros estudos chegam a apontar a existência de cerca de 12 milhões de espécies, que os métodos para estimar fungos cultiváveis ou não cultiváveis, não conseguiam detectar (WU *et al.*, 2019). Mesmo para os gêneros e espécies atualmente identificados, são proporcionalmente poucos aqueles que foram intensivamente estudados (BLACKWELL, 2011; BROCK *et al.*, 2009; McLAUGHLIN *et al.*, 2009).

Os fungos são organismos eucarióticos, heterótrofos e podem ser unicelulares como as leveduras ou pluricelulares como os cogumelos. Têm forma de vida diversificada, incluindo desde saprobiontes, comensais, simbioses e parasitas. A maioria dos fungos obtém seus nutrientes a partir de material vegetal, como saprófitas, parasitas ou como mutualistas micorrízicos (NAGY *et al.*, 2016). Muitos dos que habitam o solo são considerados saprófitos, decompondo a matéria orgânica e contribuindo para a ciclagem dos nutrientes, outros formam micorrizas com diversas espécies de plantas, sendo, em geral, cruciais para o crescimento, desenvolvimento e frutificação das mesmas (EBERSBERGER *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2002).

Os processos de decomposição de resíduos orgânicos, agregação do solo, mineralização de nutrientes, estabelecimento de relações simbióticas e o controle de pragas e doenças são realizados com a participação efetiva dos fungos. Nas últimas décadas, vem crescendo a utilização dos fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biorremediação, em virtude do alto potencial de degradação e bioassortivo (para metais pesados e corantes) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005).

Os fungos, como diversos outros seres vivos, possuem vias bioquímicas específicas para a oxidação de glicose, como a via glicolítica, podendo realizar metabolismo anaeróbico ou aeróbico (RIBEIRO; STELATO, 2011). São capazes de realizar a respiração celular, por meio do metabolismo oxidativo mitocondrial, com posterior formação de ATP na fosforilação oxidativa, bem como, ao contrário dos animais e à semelhança dos vegetais, podem converter compostos C2 a açúcares, pois possuem a via bioquímica ciclo do glioxilato. Por meio da via

glicolítica e consequente conversão a piruvato, reações bioquímicas posteriores levam à formação de precursores dos ácidos oxálico, málico, láctico, cítrico, succínico, fumárico, os quais lhes permitem atuar na quelação de metais no solo, com consequente aplicação nos processos de biorremediação. Tais ácidos apresentam ainda, importantes aplicações nas indústrias de polímeros, farmacêutica e de alimentos (ENSIGN, 2006).

Fungos filamentosos microscópicos são pluricelulares, apresentam micélio aéreo, possuem reprodução assexuada e/ou sexuada. Apresentam crescimento apical, ou seja, exibem um crescimento polarizado através da contínua extensão da hifa, estrutura morfológica fundamental que pode ser uni ou multinucleada, septada ou cenocítica. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio (ADAMS; WIESER; YU, 1998).

A principal característica dos fungos filamentosos é seu crescimento apical, descoberto pelo botânico Otto Reinhardt (1892) e intensivamente estudado a partir da segunda metade do século XX em diante, devido aos avanços tecnológicos que permitiram analisar a morfologia, a bioquímica e as características moleculares desses seres fantásticos. Porém, apesar das inúmeras descobertas, a compreensão da morfogênese fúngica permanece um desafio e para a pergunta sobre se compreendemos esse processo essencial, a resposta é “ainda não” (BARTNICKI-GARCIA, 2016). Não obstante, muitos avanços foram feitos, inclusive sobre a relação entre a extensão do ápice e a presença de um corpo multivesicular responsável pelo direcionamento e manutenção da polaridade, o Spitzenkörper, cuja existência pode ser confirmada pelo desenvolvimento da microscopia de contraste de fase.

A parede celular fúngica, com seus polímeros e estrutura peculiar é outra das características que diferenciam os fungos dos demais seres. Nos vegetais, carboidratos poliméricos como celulose e hemicelulose são emaranhados com lignina e formam a base da parede celular vegetal. Os fungos possuem uma série de outras glucanas e quitina como carboidratos constituintes de sua parede. A parede celular fúngica é uma organela dinâmica e de extrema importância, cuja função vai muito além de conferir resistência mecânica e osmótica, mas que também permite a interação com seu ambiente, além de prover desafios para o contínuo crescimento apical por exigir contínua remodelagem - síntese e degradação. Quitina é um homopolímero de beta-1,4-N-acetilglicosamina, cujas fibras se depositam exteriormente à membrana citoplasmática, conferindo resistência osmótica e sendo fundamental para a integridade da parede. As glucanas são homopolímeros de glicose com ligações que podem variar de beta-1,3 e beta-1,6 - que são as principais na parede celular dos fungos - até beta-1,4, alfa-1,3 e alfa-1,4. As glucanas se entrelaçam, formando o principal

componente estrutural da parede fúngica, ao qual são covalentemente unidos outros constituintes, como glicoproteínas (BOWMAN; FREE, 2006).

Além da parede celular, o citoesqueleto fúngico é essencial à morfogênese e nutrição. Nos fungos, um citoesqueleto de actina assume a forma de cabos, placas e anéis, esses últimos sendo formados previamente no local de deposição do septo, no processo de septação, para o qual são essenciais. As placas de actina se posicionam na periferia celular e se concentram em regiões subapicais, juntamente com cabos de actina, onde atuam sustentando o tráfego vesicular, no sistema secretório e endocítico. Já o citoesqueleto de microtúbulos é importante para sustentar o tráfego vesicular, servindo como trilhos para os endossomos e para as vesículas secretórias. Além disso, os microtúbulos também são importantes para a organização das hifas, atuando na distribuição dos núcleos e de outras organelas, além do seu papel na mitose (TAKESHITA, 2016).

Uma das estratégias de sobrevivência dos fungos é a produção de esporos, que lhes permite realizar distribuição espaço-temporal. Ao enfrentar condições adversas, podem garantir sua sobrevivência durante longos períodos de tempo, visto que seus esporos são produzidos de modo a conter moléculas protetoras para conferir durabilidade e para manterem-se inativos até que encontrem condições apropriadas para o crescimento. Diversos mecanismos de dispersão propiciam sua disseminação a longas distâncias de onde são formados (WYATT *et al.*, 2013). Algumas espécies produzem outra forma de estabilização por longos períodos de tempo, os esclerócios, constituídos de uma massa de hifas com atividade metabólica muito reduzida.

Os esporos dos fungos podem ter origem assexuada ou sexuada, sendo que as estruturas de reprodução são utilizadas como características de identificação. Diversas espécies permanecem sem que se tenha elucidado seu ciclo sexual, as quais eram anteriormente agrupadas sob a denominação “fungos imperfeitos” e atualmente são conhecidas como “fungos mitospóricos”. Os esporos são provenientes da especialização de seu micélio em órgãos ou sistemas reprodutivos, os quais podem ser endógenos ou exógenos. Algumas espécies propagam-se unicamente por crescimento vegetativo (LACAZ, 1992).

Os esporos assexuados são formados por meio da mitose, sem ocorrência de meiose. Sua variedade é imensa e de longa data são utilizados para a identificação dos fungos, que durante muito tempo foram apenas classificados com base em suas características fisiológicas e morfológicas. A morfologia dos esporos e seu processo de formação, além de outras características macro e microscópicas, continuam sendo fatores importantes para a identificação. Dentre a grande variedade de esporos assexuais formados pelos fungos, o termo

conídio é na maioria dos casos aplicados para aqueles produzidos por membros do filo Ascomycota. O processo de conidiogênese é também variado, podendo ocorrer por mecanismo blástico ou tálico. Na conidiogênese tálica, uma célula vegetativa preexistente no talo, ou seja, no corpo vegetativo, empreende um processo de diferenciação, que pode envolver a célula toda (conidiogênese tálica holoblástica), ou ocorrer por fragmentação celular, dando origem aos artro-conídios (conidiogênese tálica ártrica). A conidiogênese blástica envolve a formação dos conídios pela expansão de um ponto de uma célula conidiogênica. Se tal expansão ocorre em toda a parede celular, é denominada conidiogênese holoblástica e o esporo resultante é denominado blastoconídio. A conidiogênese blástica também pode ser enteroblástica, diferenciada da conidiogênese holoblástica pelo fato de que não toda a parede celular se expande, mas um ponto da mesma é enfraquecido, gerando uma abertura através da qual o conídio é formado. A formação da cadeia de esporos do gênero *Aspergillus* é um exemplo de conidiogênese enteroblástica (WYATT *et al.*, 2013).

A reprodução sexual dos fungos ocorre em três estágios: plasmogamia, ou seja, a fusão entre duas células compatíveis, seguida da cariogamia, na qual os núcleos de origem diferente se fusionam e dão origem ao estágio diploide, após o que, ocorre a divisão meiótica, que restaura o estágio haplóide. Esse modo de reprodução origina diferentes estruturas e esporos com características morfológicas peculiares, que têm sido tradicionalmente utilizados para a classificação taxonômica. Embora as análises moleculares tenham evidenciado novas relações filogenéticas, corrigindo erros e complexificando a classificação dos fungos, continua sendo aceita a classificação dos dois filos do subreino Dycaria: Ascomycota e Basidiomycota (WALLEN; PERLIN, 2018). Nos ascomicetos, que compreendem a maioria das espécies fúngicas descritas e inclui diversos membros com importância clínica e biotecnológica, estímulos induzem a diferenciação do micélio vegetativo para o desenvolvimento de estruturas de reprodução, denominadas ascogônio e espermata, entre duas linhagens compatíveis. Em seguida, ocorre formação do proto-ascomata que amadurece formando o ascomata, estrutura de frutificação formada por um entrelaçado de hifas, no interior da qual formam-se estruturas em forma de saco, ou ascos, responsáveis pela terminologia do filo. Para a formação dos ascos, os núcleos se fusionam e a meiose ocorre, com desenvolvimento de um ascoma maduro. Os esporos que se desenvolvem no interior dos ascos são denominados ascósporos. Ascomicetos homotáticos como *Aspergillus nidulans* e *Fusarium graminearum* são capazes de realizar tal reprodução sem a exigência de uma linhagem com *mating type* oposto, conforme determinado pelos genes reguladores da reprodução sexual (WILSON *et al.*, 2019).

Todo esse complexo modo de vida somente pode ser sustentado por elaborados mecanismos metabólicos, morfológicos e genéticos, os quais foram e podem ser ainda mais intensamente explorados como fonte de produtos e processos biotecnológicos. Pigmentos, alcalóides, hipolipemiantes, imunossupressores, anticarcinogênicos, antibióticos e diversas outras moléculas bioativas são alguns dos exemplos de fármacos de origem fúngica. Dentre a ampla gama de compostos bioativos se destacam os β -lactâmicos (penicilina e cefalosporina), várias estatinas (lovastatina, mevinolina, compactina, pravastatina, atorvastatina) e imunossupressores (ciclosporina e ergotamina) (DU; LOU, 2009; FOX; HOWLETT, 2008).

Outros produtos economicamente significativos incluem enzimas, vitaminas e ácidos orgânicos, de modo que se tornem fonte de insumos importantes para as indústrias farmacêutica, alimentícia, química e biotecnológica (ANDERSEN, 2014; LANGE, 2014).

Devido ao seu modo de vida heterotrófico e absorptivo, os fungos necessitam explorar seu ambiente na busca por nutrientes que, uma vez digeridos a moléculas com menor peso molecular, possam ser absorvidas e utilizadas internamente. Para tal, um vasto arranjo de enzimas extracelulares foi desenvolvido durante seu processo evolutivo, permitindo-lhes atuar sobre e decompor complexos polímeros vegetais, contribuindo para a reciclagem de carbono na natureza. Por essa razão, além da importância ecológica, são eficientes conversores de material lignocelulósico para a produção de biocombustíveis (NAGY *et al.*, 2016).

Os biocombustíveis sustentáveis, como bioetanol celulósico e biodiesel são usados como combustível em veículos para substituir produtos de fontes fósseis. Para tal finalidade usa-se misturas enzimáticas de fungos para quebrar a celulose e a hemicelulose a açúcares solúveis, que são fermentados por leveduras para virarem bioetanol (BUABAN *et al.*, 2010; EL BONDKLY; EL-GENDY, 2012; GUTIÉRREZ-ROJAS *et al.*, 2015; WAN; LI, 2012). Os fungos *Cunninghamella japonica* e *Mortierella isabellina* são produtores de lipídios adequados para fabricação de biodiesel (SERGEEVA *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2012).

Processos catalisados por enzimas estão gradualmente substituindo processos químicos em muitas áreas da indústria, portanto a biotecnologia utiliza de enzimas fúngicas para sintetizar produtos de base biológica que são facilmente biodegradáveis, requerem menos energia e produzem menos resíduos durante a sua produção (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016).

Apesar da grande variedade de benefícios que os fungos nos proporcionam, algumas espécies podem causar um impacto negativo, como deterioração de alimentos, doenças de animais, plantas e humanas. A produção das micotoxinas ocratoxina A e fumonisina B2 é particularmente preocupante nas indústrias de uva e café (OLIVEIRA; GRAAFF, 2011).

Assim, os fungos são tão importantes para o estabelecimento de uma bioeconomia sustentável, quanto apresentam relevância por causarem impactos negativos sobre as atividades humanas, incluindo o setor agropecuário e o setor de Saúde. Estudos aprofundados para melhor identificação e conhecimento dos mecanismos genéticos, fisiológicos e bioquímicos que sustentam seu modo de crescimento são fundamentais para o desenvolvimento de terapia antifúngica mais eficiente, bem como para melhor dirigir suas aplicações biotecnológicas, dado que muitos dos produtos que podem ser obtidos de fungos ainda carecem de ajuste dos processos para uma produção economicamente viável.

2.1.1 O gênero *Aspergillus* e a espécie *Aspergillus tubingensis*

O gênero *Aspergillus* é um dos maiores entre os fungos, incluindo 344 espécies (FRISVAD *et al.*, 2016). A ampla prevalência desse gênero se deve à alta taxa de esporulação, além da amplitude das condições em que realizam o seu crescimento, incluindo temperaturas que variam entre 6 a 55° C (KRIJGSHELD *et al.*, 2013).

O conidióforo do gênero *Aspergillus* é usualmente asseptado e com a base em forma de “T” ou “L”, a qual é denominada de “célula pé” ou haste, conectada a uma hifa vegetativa. O conidióforo se desenvolve a partir da haste, podendo apresentar diferentes comprimentos. O ápice do conidióforo se expande, formando a vesícula, na qual as células conidiogênicas e fiálides são formadas. A vesícula pode possuir diferentes formas e tamanhos, dependendo da espécie. Em algumas espécies, os conídios são produzidos a partir de fiálides que se projetam diretamente da vesícula, de modo que tais espécies são denominadas unisseriadas. Outras espécies apresentam uma segunda camada de células entre a vesícula e as fiálides, sendo que tais estruturas especializadas são denominadas metulas. A presença de medulas caracteriza as espécies bisseriadas (KOZAKIEWICZ, 1989; RAPER; FENNELL, 1965).

Apesar de possuir espécies fitopatogênicas e alguns patógenos humanos, causando doenças pulmonares que vão desde a inflamação local das vias aéreas, para infecções graves do pulmão com risco de vida, tais como aspergilose broncopulmonar alérgica e aspergilose invasiva, o gênero *Aspergillus* é notável pela ampla utilização na indústria, para produção de fármacos como: a lovastatina, alimentos e bebidas, produção de ácidos orgânicos e diversas enzimas (HORN *et al.*, 2013; JONES, 2007; SAMSON; VARGA, 2009). Uma análise do genoma de *Aspergillus niger* revelou a presença de 131 potenciais genes (*open reading frames*, ORFs) para enzimas que atuam sobre carboidratos, um verdadeiro arsenal para decomposição da parede celular vegetal e que é fonte de enzimas industriais importantes (DIJKSTERHUIS; HOUBRAKEN; SAMSON, 2013).

Fungos filamentosos desse gênero são capazes de produzir ácidos orgânicos, como: ácido málico, fumárico, succínico e cítrico a partir de glicose, sacarose e xilose. Estas fontes de carbono apresentam maior custo em comparação ao glicerol, um coproduto do Biodiesel que não tem demanda suficiente para o total produzido e é utilizado na conversão a produtos de alto valor agregado que pode ser utilizado como fonte de carbono para a obtenção de ácidos orgânicos (OCHSENREITHER *et al.*, 2014).

Diversos fungos do gênero *Aspergillus* produzem não apenas ácidos orgânicos, mas também antibióticos, micotoxinas, enzimas e compostos fenólicos, entre outras substâncias (PASSARINI, 2008). Dentre os *Aspergillus* da seção *Nigri* (*Aspergillus* negros), alguns são capazes de secretar ácidos orgânicos em quantidades maiores, sob determinadas condições de cultivo. Em um estudo para avaliação de 66 fungos, sendo 40 pertencentes ao filo Ascomycota, a totalidade das espécies de *Aspergillus* investigadas foi capaz de produzir ácidos orgânicos, inclusive *A. tubingensis* (LIAUD *et al.*, 2014).

A. niger, o principal produtor industrial de ácido cítrico, vêm sendo descrito em trabalhos científicos desde os primórdios da fermentação cítrica com fungos, descoberta por Wehmer em 1893 (SHOW *et al.*, 2015). Embora os estudos da produção biotecnológica de ácido cítrico tenham começado com espécies de *Penicillium*, a produção comercial implantada nos Estados Unidos desde 1923, utilizou *A. niger* como produtor. No Brasil, há trabalhos que empregam a espécie anteriormente utilizada para a produção comercial desde a década de 80 (BONATELLI; AZEVEDO, 1982). Desse modo, a morfologia, razão entre fonte de carbono e nitrogênio e melhor temperatura (28 °C) para o crescimento de *A. niger* 10v10 já vem sendo estudados há mais tempo (BARACHO; COELHO, 1980).

O gênero *Aspergillus* é de fácil identificação, porém a identificação das suas espécies é considerada complexa, assim como descreve Silva (2014):

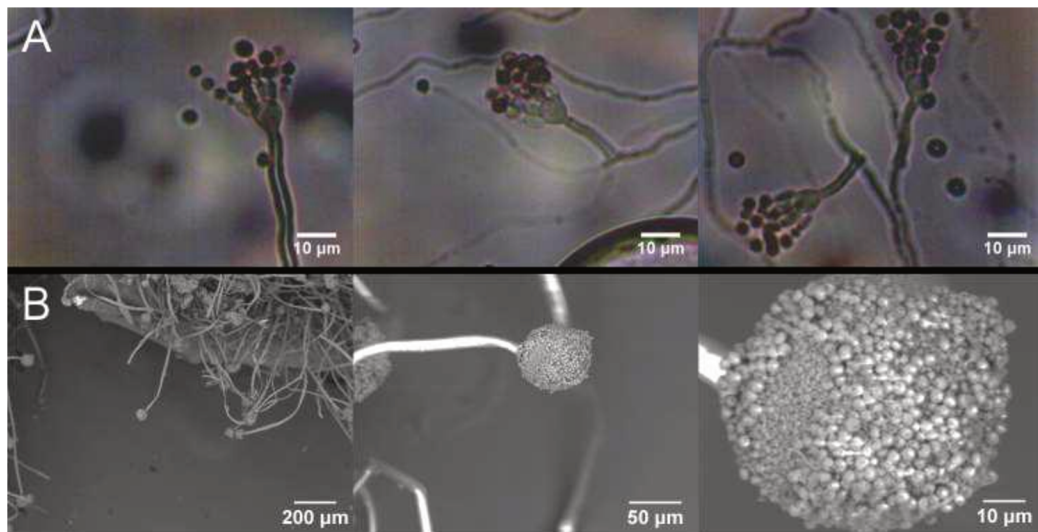
A espécie *Aspergillus tubingensis* foi descrita pela primeira vez por Raou Mosseray (1934) e é amplamente distribuída em todo o mundo, crescendo principalmente em ambientes com matéria orgânica abundante. Esta espécie é classificada dentro do filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. (BATHOORM *et al.*, 2013; MOSSERAY, 1934).

Aspergillus tubingensis é um dos *Aspergillus* negros, que somam 25 espécies. A taxonomia dos fungos pertencentes à Seção *Nigri* compreende um dos mais confusos e complexos, devido às diferenças sutis entre as espécies, que somente pode ser superado pela aplicação de metodologias e abordagens variadas. A diferenciação entre *Aspergillus* negros

deve ser feita através de uma abordagem polifásica, usando-se parâmetros morfológicos, propriedades bioquímicas e dados moleculares (BATHOORN *et al.*, 2013; FRISVAD *et al.*, 2011; KREDICS *et al.*, 2009; MANGER-JACOB *et al.*, 2005; SAMSON; VARGA, 2009; SILVA, 2014; SUSCA *et al.*, 2013; VARGA *et al.*, 2011).

A Figura 1 mostra a morfologia de conidióforos de *A. tubingensis* AN1257 isolada de amostras de vegetais em Diamantina – MG.

Figura 1 – Morfologia dos conidióforos de *Aspergillus tubingensis* AN1257



Fonte: SILVA, 2014. Observadas por microscopia óptica (A) ou eletrônica (B) em diferentes aumentos.

A. tubingensis tem o “status” GRAS (*Generally Regarded as Safe* - Geralmente Considerado Como Seguro) devido à sua baixa toxicidade e ao uso histórico na preparação e produção industrial de alimentos e bebidas, bem como na produção industrial de ácidos orgânicos (SCHMIDT, 2004).

Segundo Horn *et al.* (2013) nenhuma dentre 83 linhagens de *A. tubingensis* analisadas apresentou produção de micotoxinas. Os resultados de Lamboni *et al.* (2016) confirmaram que dentre 150 isolados de *Aspergillus* negros obtidos de castanha de caju, a espécie mais recorrente foi *A. tubingensis*, sem que tenha havido a detecção de qualquer micotoxina. Ao contrário, os isolados de *A. niger*, produziram quatro diferentes tipos de micotoxinas. Frisvad *et al.* (2011) recomendam o uso de *A. tubingensis* juntamente com várias outras espécies de fungos não tóxicos da seção dos *Aspergillus* negros para aplicações industriais.

Uma linhagem de *A. tubingensis* AN1257 vem se mostrando capaz de acumular e secretar enzimas celulolíticas, convertendo fontes variadas de carbono, inclusive biomassas vegetais e amido (SANTOS *et al.*, 2019; SILVA, 2014).

Além de hemicelulases e endoglucanases, *A. tubingensis* produz feruloil-esterases, enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster entre o ácido ferúlico e os polissacarídeos da parede celular vegetal, auxiliando no processo de conversão da biomassa lignocelulósica ao facilitar o acesso de xilanases e pectinases aos seus substratos (DILOKPMOL *et al.*, 2016).

Pectinases, enzimas largamente utilizadas na indústria de bebidas, para a clarificação de sucos, bem como na indústria têxtil e em outros segmentos, atuam sobre a pectina, um carboidrato complexo presente na lamela média entre as células vegetais. Sendo de natureza complexa, diferentes tipos de pectinases são necessárias para a completa conversão de pectina a ácido monogalacturônico, inclusive as pectina metil-esterases, enzimas produzidas por *A. tubingensis* (PATIDAR *et al.*, 2018). O ácido galacturônico tem várias aplicações industriais, inclusive na indústria farmacêutica e na produção de vitamina C.

Raol *et al.* (2015) verificaram que um isolado de *A. tubingensis* produziu também beta-galactosidase com atividade suficiente para permitir o desenvolvimento de um processo industrial.

A solubilização de fosfatos no solo é um procedimento importante para o cultivo em solos tropicais nos quais existe baixa disponibilidade desse nutriente pela sua presença na forma de sais de cálcio ou alumínio, por exemplo. Dentre os fungos utilizados para a solubilização de fosfato, *A. tubingensis* se destaca, sendo possível sua atuação por mecanismos variados. Um desses mecanismos é a elevada produção de ácidos orgânicos que complexam os metais e disponibilizam os fosfatos para absorção (RELWANI; KRISHNA; REDDY, 2008). Dessa forma, a espécie apresenta claro potencial para a produção de ácidos orgânicos, abrindo perspectiva para desenvolvimento de processos produtivos.

A gama de ácidos orgânicos produzidos pela espécie *A. tubingensis* pode direcionar o desenvolvimento e o ajuste de um processo biotecnológico de custo menor e viável, especialmente em se considerando aqueles ácidos orgânicos que ainda são de difícil obtenção, ou são produzidos a partir de petróleo, como o ácido málico. A identificação dos ácidos orgânicos produzidos por *A. tubingensis* AN1257 e sua variação em função da condição de cultivo, além de direcionar o desenvolvimento de um bioprocessos, apresenta um grande apelo científico, por contribuir para um melhor conhecimento bioquímico e metabólico desse fungo que tem apresentado grande importância industrial.

2.1.2 Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é classificado na divisão Ascomycota (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Foi inicialmente descrito e definido por Link (1809). De acordo com Fries (1821), o gênero foi inserido no Código Internacional de Botânica e durante os 100 anos posteriores, 1000 espécies tinham sido definidas. Em 1935, Wollenweber e Reinking organizaram o gênero em 16 seções com 65 espécies, 55 variedades e 22 formas.

Atualmente, com o início do sequenciamento molecular, mais de 200 espécies são reconhecidas e entre elas, 74 espécies podem causar infecções humanas. Além disso, o gênero *Fusarium* apresenta uma extraordinária diversidade genética e é distribuído globalmente entre plantas, solo e água (STAJICH *et al.*, 2009). A distribuição generalizada de espécies de *Fusarium* pode ser atribuída à capacidade destes fungos para crescer em uma ampla gama de substratos e seus mecanismos eficientes de dispersão (NELSON *et al.*, 1994).

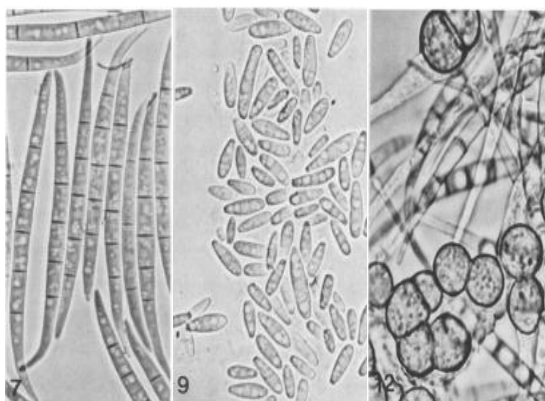
Segundo Burgess *et al.* (1988) espécies de *Fusarium* são muitas vezes considerados como fungos de solo por causa da abundância dos mesmos e sua frequente associação com as raízes das plantas, sendo parasitas ou saprófitas. Os membros patogênicos de plantas causam doenças em muitas culturas de importância agrícola como cana, trigo, arroz e banana com perdas anuais de bilhões de dólares. A podridão radicular do feijão pode ser causada por diversos fungos, inclusive por espécies de *Fusarium* (CASA *et al.*, 2011).

Há uma preocupação com a presença desses fungos em alimentos devido à capacidade de produção de micotoxinas que podem ser muito tóxicas (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016). Apesar da produção de micotoxinas, espécies de *Fusarium* produzem outros metabólitos que podem ser aplicados como pigmentos ou possuem atividades com importância no campo da medicina (FRANDSEN *et al.*, 2016). Há também o uso de espécies de *Fusarium* como biocatalisadores realizando biotransformação e síntese de compostos aromáticos (MOLINA *et al.*, 2015). Contudo, o uso de micro-organismos em processos biotecnológicos para obter aditivos industriais é vantajoso em comparação a processos químicos, uma vez que as reações geram menos resíduos tóxicos e existem menos emissões e geração de subprodutos (NÉRI-NUMA *et al.*, 2016; SIDDIQUI 2015).

Algumas espécies de *Fusarium* também podem ser de interesse clínico por serem capazes de produzir esteróides e de interferir no ciclo sexual de outros fungos (MIROCHA; CHRISTENSEN; NELSON, 1968).

Quanto à morfologia, as espécies de *Fusarium* podem produzir três tipos de esporos: macroconídios, microconídios e clamidósporos mostrados na Figura 2 (NELSON *et al.*, 1983).

Figura 2 - Macroconídio de *Fusarium avenaceum* (7), Microconídio de *Fusarium moniliforme* (9) e Clamidósporos de *Fusarium solani* (12)



Fonte: NELSON *et al.*, 1994

Os macroconídios são produzidos em estruturas especializadas em que o esporo é suportado por uma massa superficial semelhante a uma almofada (HAWKSWORTH *et al.*, 1983). Microconídios são produzidos no micélio aéreo podendo ser de várias formas e tamanhos. E o terceiro tipo de esporo formado pelas espécies de *Fusarium* é um clamidósporo, que tem uma parede espessa preenchida com material lipídico que serve para transportar o fungo durante o inverno no solo, quando um hospedeiro adequado não está disponível (NELSON *et al.*, 1994).

Há evidências de que muitas espécies de *Fusarium* respondam de formas diferentes a uma variedade de condições. Por exemplo, algumas espécies de *Fusarium longipes* e *Fusarium beomiforme* requerem temperaturas mais altas e maiores níveis de umidade para sobreviverem, típicos de regiões tropicais. Já espécies de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium culmorum* são encontradas em regiões temperadas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Devido à crescente demanda por fontes renováveis para produção de energia, novos métodos de produção de biocombustíveis ou estratégias para aumentar sua concentração são necessárias. Espécies de *Fusarium* sp. são biocatalisadores interessantes para serem usados tanto para a produção de etanol de segunda geração como para o biodiesel devido à sua viabilidade de produção de celulasas e lipases usadas nesses processos e sua capacidade de utilizar diferentes açúcares para o crescimento e fermentação do etanol. Assim sendo, mais estudos nestas áreas devem ser realizados a fim de obter um processo que possa ser atraente para os custos e competitivo industrialmente (PÊSSOA *et al.*, 2017).

Considerando o fato de que fungos filamentosos têm uma excelente capacidade de produção de proteínas extracelulares, a aplicação de *Fusarium* sp. como produtor de enzimas nos mais diversos campos, tem sido intensamente registrada no últimos anos (GUPTA *et al.*,

2016). Muitas dessas enzimas podem ser aplicadas na indústria de produção de biocombustíveis ou como componentes na formulação final de produtos (SINGH *et al.*, 2016)

O fungo filamentosso endêmico da região de Diamantina-MG *Fusarium* sp. T22.2 do estoque do laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) é capaz de fazer a bioconversão de glicerol para L-asparaginase. Em estudos preliminares, após triagem dentre 13 fungos filamentosos, *Fusarium* sp. T22.2 mostrou elevado potencial para a produção da enzima, tendo uma atividade enzimática capaz de hidrolizar L-asparagina e liberar 11,4 µg de amônia por mL por minuto de reação – equivalente a aproximadamente 0,7 UI (GONÇALVES *et al.*, 2016). Esse estudo contribui para a diminuição dos custos de produção de L-asparaginase e abre como perspectiva a possibilidade de desenvolvimento de um bioprocessso para aproveitamento de glicerol.

2.2 Glicerol: um coproduto do biodiesel que pode ser transformado em produtos de alto valor agregado

Os biocombustíveis surgiram como uma fonte sustentável de combustível na busca por recursos energéticos e são considerados um importante progresso tecnológico na diminuição das emissões de gases, com consequente diminuição da poluição, melhorando a qualidade do ar. Os biocombustíveis são produzidos a partir de materiais naturais e renováveis e entre os biocombustíveis mais comuns, estão: o etanol gerado a partir da cana-de-açúcar, milho, trigo ou beterraba e o biodiesel produzido a partir de sementes oleosas e ou gordura animal (QUISPE *et al.*, 2013).

O biodiesel se insere no contexto do forte apelo por combustíveis alternativos para motores a diesel e da grande demanda de energia renovável. É uma alternativa ambientalmente segura aos combustíveis fósseis, pois se utiliza de matérias-primas oriundas de fontes naturais que podem ser renovadas na natureza (SCHNEIDER *et al.*, 2014)

Este biocombustível é produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais, que são submetidos a reações químicas, sendo a principal a transesterificação. Nesta reação, os óleos reagem com um álcool de cadeia curta (etanol ou metanol) na presença de um catalisador (usualmente uma base) para produzir ésteres alquílicos, sendo o glicerol seu principal coproduto (MEHER *et al.*, 2006). No Brasil, há dezenas de espécies de plantas que podem ser utilizadas na reação de transesterificação, tais como: soja, mamona, dendê, girassol, babaçu, amendoim e pinhão manso, dentre outras, além de sebo bovino (BEATRIZ *et al.*, 2011).

Segundo Choi *et al.* (2008) o glicerol (1,2,3-propanotriol) é um álcool e o principal componente dos triglicerídeos, encontrado na gordura animal, no óleo vegetal ou no óleo bruto. Este composto é derivado da fabricação de sabão ou de biodiesel. O glicerol é conhecido desde 2800 a. C. quando foi isolado por aquecimento de gordura misturada com cinzas para produzir sabão (HUNT, 1999). No entanto, considera-se ter sido descoberto em 1779 pelo farmacêutico suíço K. W. Scheele, que foi o primeiro a isolar este composto quando aqueceu uma mistura de óxido de chumbo com azeite de oliva. Em 1811, o químico francês M. E. Chevrel chamou o glicerol de líquido, definindo as fórmulas químicas dos ácidos graxos e as fórmulas de glicerol em óleo vegetal e gordura animal. Seu trabalho foi patentado e conhecido como o primeiro método industrial para obter sabão de glicerol, de ácidos graxos com material alcalino e cal (GESSLEIN, 1999).

O glicerol formado como coproduto do biodiesel é contaminado com diferentes compostos como: sais, metanol, metais pesados, ácidos graxos e ésteres metílicos resultando no glicerol “bruto” de difícil descarte ou aproveitamento, exigindo uma purificação para inserí-lo no mercado (JOHNSON *et al.*, 2016). O processo de purificação do glicerol bruto não é rentável devido ao baixo preço do glicerol refinado. Assim, a utilização direta do glicerol bruto é de total importância, tendo em vista a valorização e o desenvolvimento sustentável da indústria de biodiesel (CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012).

Segundo Zhou *et al.* (2018) o glicerol bruto representa aproximadamente 10% em peso de biodiesel dos produtos da reação de transesterificação e já tem um grande excedente como resultado do crescimento explosivo da produção de biodiesel. O glicerol bruto pode ser consumido diretamente em alimentos para animais, para proteção de carvão contra o congelamento e armazenamento de grãos, mas quando o mercado está com excesso de oferta e os preços estão baixos, o produto bruto é queimado localmente como forma de energia (BIZZARI *et al.*, 2018).

A produção mundial de biodiesel está aumentando continuamente devido ao crescimento e demanda por combustíveis de fontes renováveis. Em 2017, mais de 30 bilhões de litros de biodiesel foram produzidos e cerca de 6 bilhões de litros de glicerol efluente (MURAZA, 2019).

Mesmo o glicerol sendo um produto de valor agregado por sua versatilidade e possibilidade de transformação em outros produtos, há uma preocupação com a enorme quantidade gerada deste insumo e pela incapacidade de total absorção pelo mercado nacional. Em 2012 eram produzidos aproximadamente 230 mil m³ de glicerol por ano para cumprir a

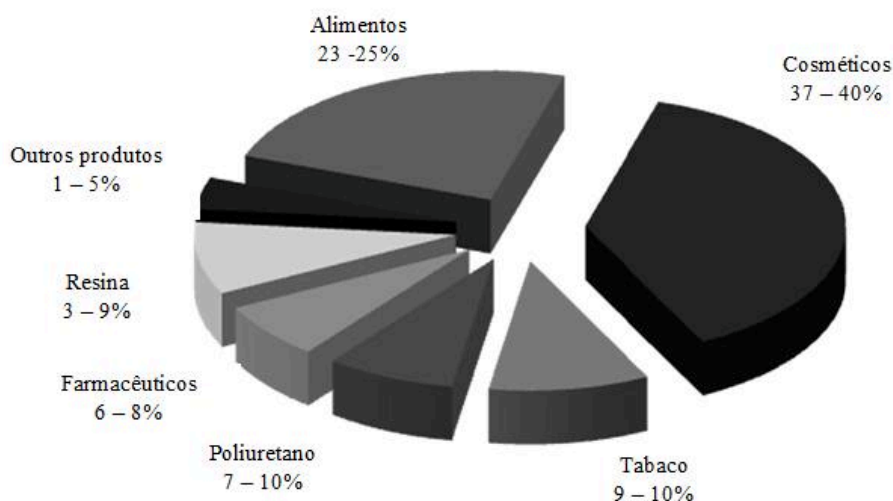
exigência imposta pelo B5 (meta estipulada pelo governo que impõe a adição de 5% de biodiesel a todo diesel comercializado em território nacional) (LEONEL *et al.*, 2012).

Recentemente, muitos países como a Indonésia liberaram o B20 (Biodiesel 20%). Já a Tailândia tem como objetivo usar 9 bilhões de litros de biodiesel até 2020 e essa tendência aumentará a produção de glicerol (MONTEIRO *et al.*, 2018). Segundo Ren21 (2018) o Brasil produziu 4,3 bilhões de litros de biodiesel e 0,86 bilhões de litros de glicerol ficando atrás apenas dos Estados Unidos que produziu 6 bilhões de litros de Biodiesel e 1,2 bilhões de litros de glicerol.

A Ásia continua sendo o maior detentor do glicerol refinada, tanto na oferta quanto no consumo, com a região respondendo por mais de 40% do total mundial em 2017. Nos últimos anos, por causa do mercado emergente de diesel renovável (que compete com o biodiesel, mas cuja produção não gera glicerol), bem como a mudança de foco nas políticas de biocombustíveis, o crescimento da oferta de glicerol bruto pode ter se estabilizado em ambos os países europeus e mercados dos EUA (BIZARRI *et al.*, 2018).

Segundo Quispe *et al.* em 2013, havia mais de 2 mil usos para o glicerol, mas eram utilizadas pequenas quantidades do mesmo. São poucos os produtos que necessitam de uma grande quantidade de glicerol em sua fórmula. Os principais usos do glicerol refinado são em produtos de higiene pessoal e higiene oral, incluindo cosméticos, produtos de cuidados com a pele, creme dental e enxaguante bucal, produtos alimentícios e bebidas, produtos que incluem tabaco, detergentes, celofane, explosivos e produtos farmacêuticos (FIG. 3).

Figura 3 - Porcentagem mundial do uso de glicerol



Fonte: Adaptado de: STELMACHOWSKI, 2011.

No entanto, é consenso na comunidade científica de que é necessário buscar outros meios de consumo de tal coproduto. Assim, uma das muitas aplicações promissoras do glicerol é a bioconversão a produtos de alto valor agregado por fermentação microbiana, oferecendo a oportunidade de obter produtos com rendimentos mais elevados do que aqueles utilizando açúcares (DHARMADI, 2006).

Dessa forma, para estimular a produção de ácidos orgânicos e L-asparaginase no país, desenvolvendo processos produtivos biotecnológicos viáveis, uma das premissas é estabelecer a produção a partir de substratos alternativos. Dentre estes, o glicerol um coproduto da cadeia produtiva de biodiesel, pode se mostrar uma excelente fonte de carbono, uma vez que possui um caminho bioquímico de oxidação que resulta na formação de um intermediário da via glicolítica, normalmente utilizada pelos micro-organismos para a oxidação de açúcares.

2.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos ocorrem naturalmente nos alimentos, sendo sua formação resultante de processos metabólicos, bioquímicos, hidrólises e do crescimento microbiano. Nos vinhos, estes ácidos, provenientes da uva (tartárico, málico e cítrico) e dos processos de fermentação alcoólica e malolática (lático e succínico), contribuem com a cor, aroma, gosto, características e equilíbrio gustativo e para a estabilidade microbiológica e química (LIMA *et al.*, 2010; KALLITHRAKA *et al.*, 1997; RIZZON *et al.*, 2007).

São também utilizados como acidulantes na fabricação de bebidas a base de frutas e vegetais. Os principais ácidos utilizados para realçar sabores são: os ácidos cítricos e tartárico. O ácido ascórbico é amplamente utilizado como antioxidante em sucos. Entretanto, por causa de sua natureza, é oxidado durante o período de estocagem (SCHERER *et al.*, 2008).

O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, é um ácido orgânico fraco, que se pode encontrar nos citrinos. Este ácido é utilizado como conservante natural (antioxidante) e como acidulante em sucos de fruta (dando um sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e de bebidas), pelo fato do pH natural dos produtos não ser suficiente para assegurar a estabilidade microbiana a longo prazo. O ácido cítrico é obtido na indústria graças à fermentação da sacarose realizada pelo fungo filamentoso *A. niger* (PASTORE *et al.*, 2011). A produção de ácido cítrico depende principalmente do potencial de síntese do micro-organismo utilizado, porém as condições do processo e a composição do meio fermentativo são variáveis importantes que, quando otimizadas, podem promover um acréscimo no rendimento (MILLIS, 1985).

Desde 1930, existe a preocupação de se elucidar os mecanismos bioquímicos que provocam o acúmulo de ácido cítrico no meio de cultivo com micro-organismos. O ácido cítrico só se acumula nas seguintes condições: quando vários componentes estão presentes em altas concentrações (açúcar, acidez, oxigênio) e quando outros estão em níveis abaixo do ótimo (íons metálicos, nitrogênio, fosfato) (LEONEL, 1995).

Segundo Rywin'ska (2010) a indústria do ácido cítrico é uma das maiores do setor de Biotecnologia, com produção que alcança 1,6 milhões de toneladas e cresce anualmente em torno de 3,5-4% em consumo. Apesar disso, a produção de ácido cítrico no mercado brasileiro é bastante inferior ao consumo, gerando custos de importação deste ácido, que apresenta elevada aplicabilidade em alimentos, bebidas, medicamentos e cosméticos (EMEKA *et al.*, 2012). Os custos e o volume de produção inferior à demanda podem ser explicados, em parte, pelos substratos que são utilizados como fonte de carbono: carboidratos como sacarose e glicose, que além do custo, apresentam outras aplicações comerciais.

O ácido tartárico da uva é o isômero L(+), sendo a videira um dos poucos vegetais onde este ácido está presente em quantidades elevadas. O isômero L(-) do ácido málico, encontrado nas folhas e frutos, é um dos mais difundidos na natureza e possui pouca resistência à oxidação, enquanto seu precursor, o ácido cítrico, está presente nas raízes. (FERNANDES *et al.*, 2006; RIZZON *et al.*, 2007). O ácido láctico, produzido durante a fermentação malolática, confere suavidade gustativa, e o ácido succínico é um subproduto da fermentação alcoólica (KRITSUNANKUL *et al.*, 2009).

Os ácidos málico e fumárico são atualmente utilizados na alimentação como acidulantes. O ácido málico é também utilizado na limpeza de metais, acabamento têxtil, produtos farmacêuticos, infusões médicas e tintas (GOLDBERG *et al.*, 2006). Os ácidos 1,4-dicarboxílicos succínico, málico e fumárico não somente são produzidos por todos os organismos vivos, fazendo parte do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), como também foram identificados entre os 12 produtos químicos de maior valor agregado obtidos a partir de biomassa pelo Departamento de Energia dos EUA (WERPY; PETERSEN, 2004). Embora os ácidos orgânicos acima mencionados façam parte do ciclo do TCA, nem sempre se acumulam no organismo em condições normais. Mas, certos gêneros de fungos filamentosos, por exemplo, *Rhizopus* e *Aspergillus*, são conhecidos pela produção de grandes quantidades de ácido fumárico e ácido málico e liberação para o meio de cultura, quando cultivados sob condições de estresse (ABE *et al.*, 1962; BATTAT *et al.*, 1991; MAGNUSON; LASURE, 2004). Por exemplo, ácidos fumárico e málico são acumulados por esses fungos como

produtos finais do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, se cultivados em condições de excesso de fonte de carbono (GOLDBERG *et al.*, 2006).

Apesar do grande potencial de fungos filamentosos para produzir ácidos orgânicos, não existem bioprocessos comerciais estabelecidos para a obtenção de alguns desses ácidos devido à falta de viabilidade econômica. Assim, ácido fumárico e málico ainda são exclusivamente derivados do petróleo. Para resolver o problema da ineficiência de processos biotecnológicos, vários aspectos devem ser tomados em conta, como: diminuição de custos de produção pelo uso de fontes de nitrogênio baratas e o uso de fontes de carbono renováveis (OCHSENREITHER *et al.*, 2014).

2.4 A enzima L-asparaginase

A L-asparaginase (L-asparagina amino hidrolase, E.C. 3.5.1.1) é uma enzima que catalisa a reação irreversível de degradação da L-asparagina em L-aspartato e amônia em ambientes aquosos (SHANTHIPRIYA *et al.*, 2015). É uma enzima que têm ganhado destaque por suas diversas e importantes funções, como na indústria alimentícia, na qual é usada para reduzir os níveis de acrilamida (uma substância carcinogênica), que é formada quando os alimentos são fritos ou cozidos em altas temperaturas, especialmente em alimentos ricos em carboidratos como batatas, pães e biscoitos (CACHUMBA *et al.*, 2016).

A formação de acrilamida em alimentos aquecidos é devida principalmente à reação da asparagina livre com açúcares redutores (MAHAJAN *et al.*, 2012). Quando se adiciona L-asparaginase antes de cozinhar alimentos ou fritá-los, a enzima degrada L-asparagina e assim, a formação de acrilamida pode ser significativamente reduzida. Atualmente, as L-asparaginases de *A. niger* e *Aspergillus oryzae* foram comercialmente utilizadas com o objetivo de reduzir a formação de acrilamida (ZUO *et al.*, 2015).

Na indústria farmacêutica é uma das principais enzimas terapêuticas de origem microbiana usada para tratar uma série de desordens linfoproliferativas, principalmente a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), outras doenças malignas do sistema linfóide e linfomas de Hodgkin's. A mesma pode induzir remissão completa em até 80% dos pacientes que sofrem de LLA. Por seu potencial anticarcinogênico recebeu uma atenção crescente nos últimos anos (EINSFELDT *et al.*, 2016).

Ao contrário das células normais que podem sintetizar L-asparagina, as células tumorais requerem abundância desse aminoácido para garantir um crescimento rápido (LUHANA; DAVE; PATEL, 2013). Desse modo, a L-asparaginase se converte em um princípio ativo seletivo para as células leucêmicas, uma vez que, quando administrada por via

intravenosa, atua hidrolisando a L-asparagina sanguínea afetando apenas a viabilidade de células cancerígenas, sem atingir as células normais (ALI *et al.*, 2016).

As leucemias linfoblásticas agudas (LLA) são responsáveis pela maior frequência das leucemias na primeira infância (menores de 5 anos) e pelo pico etário da incidência entre 2 e 3 anos, além de serem mais frequentes em meninos. Depois dessa idade, a leucemia apresenta uma estabilidade de frequência até os 19 anos. Existe uma variação das taxas de incidência das leucemias de acordo com as regiões geográficas no mundo. As maiores taxas de incidência, para a faixa etária de 0 a 19 anos, foram encontradas em regiões da Itália, com cerca de 100 casos por milhão, no sexo masculino e, para o sexo feminino, entre 70 e 110 casos por milhão em registros de câncer da Espanha, Argentina, Itália e Estados Unidos. Já as menores taxas foram encontradas nos registros de câncer Africanos e na China, com menos de 20 casos por milhão no sexo masculino. Para o sexo feminino, também foram observadas taxas menores do que 20 casos por milhão em alguns registros da Índia e da África do Sul e na população negra do Colorado (Estados Unidos). Essas variações são alvo de constantes debates da literatura, relacionando indicadores socioeconômicos que demonstram diferenças entre populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento (INCA, 2016).

A sobrevida de leucemia também possui variação geográfica. As maiores sobrevidas de LLA (acima de 90%) foram observadas, para o período de 2005 a 2009, na Áustria, na Bélgica, no Canadá, na Alemanha e na Noruega. Já as menores, inferiores a 50%, foram observadas na Indonésia e na Mongólia. No Brasil, para o período de 1995 a 2009, a sobrevida variou de 72% a 66% (ALLEMANI *et al.*, 2015). Esses dados nos mostram o quanto é preciso investir em pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos, com menos efeitos colaterais contra a LLA no Brasil, já que em países desenvolvidos com recursos para o tratamento das leucemias, a sobrevida é maior que em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos.

A enzima L-asparaginase produzida por *Escherichia coli* foi isolada por Mashburn e Wriston (1964) que avaliaram e descobriram sua atividade enzimática. A partir daí, tornou-se crescente o interesse em encontrar outras fontes microbianas de L-asparaginase. Efeitos colaterais como choque anafilático, imunossupressão e toxicidade dos tecidos foram relatados em pacientes nos quais foi ministrada L-asparaginase produzida por *E. coli*. Na década de 70, pesquisadores empenharam-se em reduzir respostas imunológicas da L-asparaginase. Tais esforços resultaram na aceitação pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1994 do uso da enzima de *E. coli* conjugada com polietileno-glicol (PEG), pois o mesmo diminui quase por completo as reações alérgicas. Esse produto foi disponibilizado sob o nome comercial de

ONCASPASPAR[®] (FDA, 2006). Todavia, o complexo PEG-L-asparaginase compromete a qualidade terapêutica da enzima.

Uma nova fonte de L-asparaginase surgiu pelo estabelecimento da produção com *Erwinia chrysanthemi*. O uso da L-asparaginase produzida por *E. chrysanthemi* é uma opção para pacientes que já reagiram contra a L-asparaginase produzida por *E. coli*. A L-asparaginase de *E. chrysanthemi* foi aprovada pela FDA em 2011 (BATTOOL *et al.*, 2016). Contudo, essa enzima também apresentou efeitos relacionados a respostas imunológicas e toxicológicas como dificuldade para respirar, olhos inflamados, bronco-aspiração e pancreatite (FERNANDEZ *et al.*, 2014).

Até o momento, são utilizadas formulações comerciais da enzima produzida por bactérias, as quais geram vários efeitos colaterais, e uma forma enzimática conjugada com um polímero que reduz seus efeitos tóxicos e aumenta o tempo de meia-vida, mas que lamentavelmente não é tão eficiente como a nativa. Assim sendo, *E. coli* e *E. chrysanthemi* são as principais fontes de L-asparaginase (EMADI; ZOKAEE; SAUSVILLE, 2014).

No entanto, a diminuição de asparagina circulante pelo uso de L-asparaginase não é suficiente para um tratamento bem sucedido de LLA. O tratamento do câncer com L-asparaginases tem sido dificultado pela atividade da glutaminase intrínseca a algumas asparaginases bacterianas como a de *E. coli* e *Erwinia*. A atividade glutaminásica pode causar disfunção hepática, pancreatite, leucopenia, convulsões neurológicas, anormalidades da coagulação que levam à trombose intracraniana ou hemorragia (DUVAL *et al.*, 2002).

Por isso, é desejável encontrar maneiras de produzir L-asparaginase com melhores rendimentos e encontrar enzimas com pouca ou nenhuma atividade de glutaminase (MAHAJAN *et al.*, 2012).

A L-asparaginase está presente na maioria dos protocolos de quimioterapia e a sua administração aumentou o número de pacientes que entraram em remissão, obtendo uma maior sobrevida dos portadores de LLA para mais de 90% nos últimos anos, demonstrando a relevância deste medicamento (ABI *et al.*, 2014; SHIRIVASTA *et al.*, 2016).

Enzimas microbianas têm sido reconhecidas mundialmente por suas várias utilidades, como no setor da indústria, alimentos, agricultura, química, médica e energia. Em 2014 o mercado global de enzimas industriais foi estimado em US \$ 4,2 bilhões e espera-se chegar a uma taxa de crescimento anual (CAGR) de aproximadamente 7% durante o período de 2015 a 2020 para atingir quase US \$ 6,2 bilhões (SINGH *et al.*, 2016). Segundo a WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015), a L-asparaginase está listada como sendo um dos medicamentos mais importantes na rede de saúde pública, mostrando que qualquer país deve obter um

orçamento para sua aquisição, sendo necessário manter um estoque desse medicamento. Em dezembro de 2012, ELSPAR® (a forma comercial de L-asparaginase nativa proveniente de *E. coli*) deixou de ser disponível nos Estados Unidos (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Quando potências mundiais enfrentam crise de abastecimento de um produto essencial, se abrem perspectivas e oportunidades. Esta é uma grande oportunidade para o Brasil entrar no mercado farmacêutico de enzimas terapêuticas aproveitando sua vasta biodiversidade (ARDILA, 2017).

No Brasil, a L-asparaginase é importada e apenas o medicamento contendo enzima obtida de *E. coli* na sua forma livre (não peguilada) tem sido utilizado no tratamento de LLA. Sendo que até o ano de 2012, foi comercializado apenas o medicamento Elspar® (Lundbeck, Deerfield, IL, EUA). Com a descontinuidade de sua produção, entre Janeiro de 2013 e Março de 2017, o medicamento Aginasa® (Medac, AL), de origem alemã, passou a ser utilizado no País. No entanto, a partir 20 de abril de 2017, o Ministério da Saúde importou uma L-asparaginase de origem chinesa, sob o nome comercial Leuginase® (Beijing, China). Houve desde então diversas discussões sobre a eficiência terapêutica e a qualidade deste medicamento, já que este último não tem comprovação de eficácia e não foram feitos testes suficientes em humanos para que pudesse ser utilizado em pacientes (BOLDRINI, 2019).

Portanto é imprescindível o desenvolvimento e produção de uma L- asparaginase alternativa e inovadora pelo Brasil que possibilitaria a diminuição do custo do tratamento de leucemia, evitando o desabastecimento nacional e possibilitando uma oportunidade de tratamento aos pacientes que desenvolvessem efeitos colaterais aos medicamentos que já existem no mercado.

Na produção industrial de L-asparaginase vários fatores são importantes para que se obtenha uma melhor produção e viabilidade econômica. Por exemplo, o tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH, aeração, temperatura, tempo de fermentação e, principalmente, o agente microbiano têm muita influência no processo (BASKAR; SAHADEVAN, 2012). As fontes de carbono mais comuns utilizadas são: glicose, amido e maltose, que podem ser substituídas por glicerol para micro-organismos que fazem essa conversão (CACHUMBA *et al.*, 2016). Existem processos de produção dessa enzima por fermentação sólida, mas o principal modo de produção acontece por fermentação submersa (LOPES *et al.*, 2015).

Diante da crise de abastecimento de L-asparaginase no mercado internacional e nacional, e pela perspectiva de que novas fontes microbianas eucariontes possam produzir

uma enzima com propriedades terapêuticas, porém com menor toxicidade, os fungos são evidenciados como potenciais produtores. A busca por linhagens produtoras entre os fungos decorre do seu potencial genético, visto que possuem em seus genomas numerosos genes codificadores de enzimas, os quais sustentam seu modo de vida heterotrófico e seu papel decompositor, balizando sua versatilidade para crescimento em variadas condições, bem como sua capacidade de utilizar e converter ampla gama de fontes de nitrogênio e carbono, inclusive o glicerol. Nessa perspectiva foram estabelecidos os objetivos do presente trabalho, descritos a seguir.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar o potencial da linhagem *A. tubingensis* AN1257 para a conversão de glicerol e sacarose a ácidos orgânicos, bem como de *Fusarium* sp. T22.2 para a conversão de glicerol a L-asparaginase.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a secreção de ácidos orgânicos totais pelo fungo filamentoso *A. tubingensis* AN1257 e pela linhagem padrão *A. niger* 10v10;
- Determinar a melhor fonte de carbono para a secreção de ácidos totais por *A. tubingensis* AN1257;
- Desenvolver processos submersos para a produção de ácidos orgânicos por *A. tubingensis* AN1257;
- Determinar a gama de ácidos orgânicos produzidos por *A. tubingensis* AN1257;
- Quantificar a produção de ácidos orgânicos e avaliar a potencialidade da linhagem *A. tubingensis* AN1257 para a produção biotecnológica;
- Determinar o efeito da fonte de carbono e do pH sobre o acúmulo do ácido orgânico de interesse por *A. tubingensis* AN1257;
- Avaliar o potencial de *Fusarium* sp. T22.2 para a produção de L-asparaginase;
- Determinar o efeito da concentração da fonte de carbono, do substrato indutor e do pH sobre a produção de L-asparaginase por *Fusarium* sp. T22.2;
- Desenvolver bioprocessos melhorados para a produção de L-asparaginase por *Fusarium* sp. T22.2;
- Verificar a produção de atividade de L-glutaminase por *Fusarium* sp. T22.2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados neste trabalho foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Fungos no Departamento de Farmácia pertencente à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), no Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação do prédio de Pós-Graduação em Biocombustíveis da UFVJM, no Laboratório Multiusuário de Equipamentos LPP-Jequi/UFVJM e no LIPEMVALE/UFVJM.

4.1 Linhagens e Manutenção

As linhagens utilizadas nesse trabalho foram: *A. tubingensis* AN1257 (RODRIGUES, 2011) isolada em Diamantina-MG, *A. niger* 10v10 (BARACHO; COELHO, 1980) e *Fusarium* sp. T22.2 (SILVA, 2011) isolada em Diamantina-MG (FIG. 4). As linhagens pertencem ao estoque do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Farmácia da UFVJM.

Figura 4 - *Aspergillus tubingensis* AN1257 (A), *Fusarium* sp. T22.2 (B) e *Aspergillus niger* 10v10 (C)



As linhagens *A. tubingensis* AN1257 e *A. niger* 10v10 foram repicadas continuamente em placas com meio de cultura ágar batata-dextrosado (PDA, *Potato Dextrose Agar*) e incubadas por 7 dias a 30 °C em estufa do tipo B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio). A linhagem *Fusarium* sp. T22.2 foi cultivada pelo mesmo tempo e na mesma temperatura porém em ágar Czapek-Dox (FRISVAD; SAMSON, 2004). Para manutenção, foram realizados repiques a cada quatro meses em tubos de ensaio contendo meio de cultura PDA ou

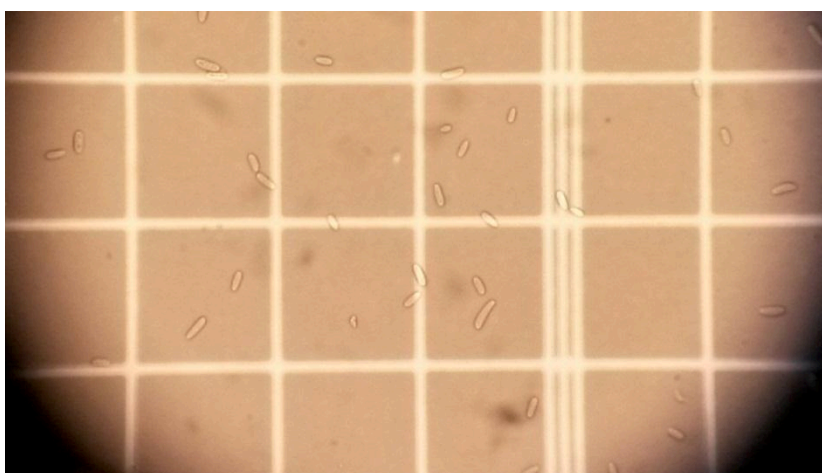
Czapek-Dox dependendo da linhagem. Todas as placas, tubos e meios de cultura foram previamente autoclavados por 15 minutos a 1,1 atm e 121 °C.

Para o armazenamento e preservação, após o cultivo das linhagens em meio sólido por 7 dias a 30 °C, pequenos blocos de ágar contendo micélio foram estocados em micro-tubos de 2 mL contendo água destilada estéril e mantidos sob refrigeração (4 ± 1 °C) com repiques a cada 6 meses (CASTELANI, 1963).

4.2 Preparo de inóculo

Os experimentos foram realizados utilizando-se inóculo preparado a partir das linhagens cultivadas a 30 °C em estufa bacteriológica por 7 dias, como descrito no item 4.1. Os esporos foram coletados em água destilada estéril a partir das colônias maduras, com auxílio de uma pipeta de vidro estéril, em condições assépticas, em capela de fluxo laminar. Após filtração em gaze, a suspensão de esporos foi armazenada em frasco âmbar estéril e submetida à contagem em câmara de Neubauer, sob diluição 1:10 e/ ou 1:100. A contagem foi realizada ao microscópio óptico, com aumento de 400X, no campo de hemácias, conforme metodologia descrita por (RAIMBAULT; ALAZARD *apud* PARIS, 2008). Para a inoculação dos meios de produção, foi utilizada concentração final de 1×10^6 mL⁻¹ de esporos para as linhagens *A. tubingensis* AN1257 e *A. niger* 10v10 e 1×10^5 mL⁻¹ de esporos para a linhagem *Fusarium* sp. T22.2. Os esporos de *Fusarium* sp. T22.2 são mostrados na Figura 5.

Figura 5 - Esporos de *Fusarium* sp. T22.2



Os esporos foram coletados de colônias cultivadas a 30 °C durante 7 dias e vistos ao microscópio óptico sob aumento de 400x.

4.3 Conversão de glicerol e sacarose a ácidos orgânicos

A utilização de fontes de carbono pelas linhagens pertencentes ao gênero *Aspergillus* para a secreção de ácidos orgânicos foi investigada. Uma triagem da produção de ácidos foi primeiramente conduzida em meio sólido para comparação entre as duas linhagens, *A. tubingensis* AN1257 e *A. niger* 10v10, bem como para avaliação dos efeitos do pH e da fonte de carbono. Foi utilizado como fontes de carbono em todos os experimentos de produção de ácidos: glicerol P.A. e sacarose. Em seguida, a produção de ácidos orgânicos por *A. tubingensis* AN1257 em processo submerso foi analisada.

4.3.1 Triagem da produção de ácidos orgânicos em meio sólido

A triagem da secreção de ácido pelas linhagens *A. tubingensis* AN1257 e *A. niger* 10v10 foi realizada em meio sólido de acidogênese suplementado com: glicerol ou sacarose como fonte de carbono em concentração de $[120 \text{ g L}^{-1}]$; sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $[3 \text{ g L}^{-1}]$ como fonte de nitrogênio; fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) $[1 \text{ g L}^{-1}]$; fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) $[1 \text{ g L}^{-1}]$; verde de bromocresol como indicador ácido-base $[0,4 \text{ g L}^{-1}]$ e ágar $[15 \text{ g L}^{-1}]$. A triagem foi realizada em meios ajustados para pH 4,0 e 6,0. Os pHs foram ajustados com ácido clorídrico (HCl) a $[0,1 \text{ mol L}^{-1}]$. Para o teste de triagem da produção de ácidos orgânicos, as linhagens *A. tubingensis* AN1257 e *A. niger* 10v10 foram repicadas em placas de Petri contendo PDA e incubadas a 30 °C durante 7 dias. Após o crescimento, os conídios foram coletados como descrito no item 4.2 e diluídos para a obtenção de 50 conídios em 10 µL, os quais foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio de acidogênese. Em seguida, as culturas foram incubadas a 30 °C por 7 dias. O diâmetro da colônia (halo de crescimento) e do halo de viragem indicativo da produção de ácido foram medidos horizontalmente e verticalmente a partir do inóculo central, no período de 24 até 168 horas. O índice de acidogênese (IA) foi determinado pela razão: média do diâmetro do halo ácido/ média do diâmetro do halo de crescimento da colônia. As culturas e a determinação do IA foram realizados em triplicata.

4.3.2 Produção de ácidos orgânicos por processo submerso

A produção de ácidos orgânicos em meio líquido por processo submerso foi conduzida com a linhagem *A. tubingensis* AN1257. O meio de produção foi elaborado de modo a conter uma formulação básica: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $[3 \text{ g L}^{-1}]$; KH_2PO_4 $[1 \text{ g L}^{-1}]$ e K_2HPO_4 $[1 \text{ g L}^{-1}]$.

Os meios foram suplementados com fontes de carbono glicerol ou sacarose. A concentração da fonte de carbono e o pH foram utilizados como variáveis independentes de

um desenho composto central (DCC) delineado com o *software Statistica 7.0*. Foram gerados 4 bioprocessos (A-D) combinando os níveis mínimo e máximo de cada variável – 6% e 12% para a fonte de carbono; 4 e 7 para o pH – mais dois processos contendo os pontos axiais para cada variável, resultando em quatro bioprocessos de pontos axiais (E-H). Os bioprocessos E e F, contendo os pontos axiais da variável concentração da fonte de carbono foram gerados utilizando-se alfa para (rotatabilidade) igual a aproximadamente 12,4 e mantendo-se o ponto central da variável pH. Os bioprocessos G e H, contendo os pontos axiais da variável pH foram gerados utilizando-se alfa (rotatabilidade) com valor aproximadamente igual a 0,6 e mantendo-se o ponto central da variável concentração da fonte de carbono.

Bioprocessos de I a L, denominados pontos centrais do DCC, foram gerados combinando-se os valores médios entre os níveis máximos e mínimos da concentração de fonte de carbono e do pH. Todos os bioprocessos resultantes do DCC foram conduzidos em meio suplementado com glicerol e repetidos em meio suplementado com sacarose como fonte de carbono (TAB. 1).

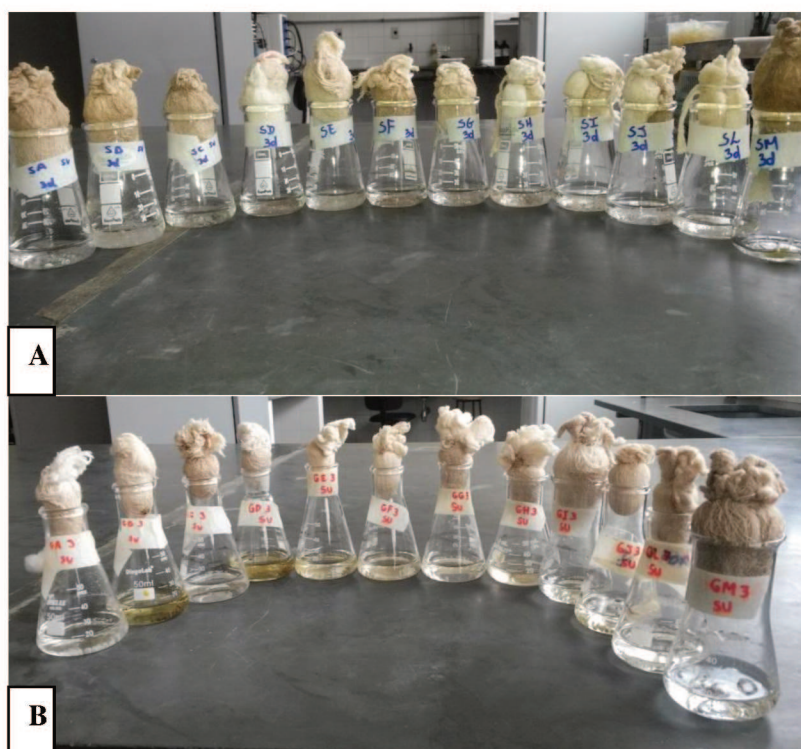
Tabela 1 – Bioprocessos delineados por desenho composto central para produção de ácidos orgânicos

Bioprocesso	Variáveis Independentes	
	Fonte de carbono (%)	pH
A	6,0	4,0
B	6,0	7,0
C	12,0	4,0
D	12,0	7,0
E	4,75	5,5
F	13,24	5,5
G	9,0	3,37
H	9,0	7,62
I	9,0	5,5
J	9,0	5,5
L	9,0	5,5

Os pontos centrais das variáveis concentração da fonte de carbono [9%] e pH (5,5) foram gerados e utilizados para a condução de bioprocessos conduzidos em triplicata. Os bioprocessos foram denominados com G quando conduzidos em meio suplementado com glicerol (GA-GL) e S quando conduzidos em meio suplementado com sacarose (SA-SL). Todos os bioprocessos resultantes do DCC foram conduzidos e analisados nos tempos 0 (sem inóculo) 3, 6 e 9 dias de cultivo resultando em 44 bioprocessos para cada fonte de carbono. As culturas foram inoculadas para uma concentração final de esporos de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ e incubadas a 30 °C sob 150 rpm de agitação.

As análises para determinação da produção de ácidos orgânicos foram realizadas por titulometria, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa acoplada com detector de massa (CG-Ms) e eletrospray de alta resolução (ESims). Na Figura 6 são mostrados os bioprocessos submersos após 3 dias de cultivo em meio suplementado com glicerol e sacarose.

Figura 6 - Bioprocessos submersos conduzidos com *Aspergillus tubingensis* AN1257



Bioprocessos em várias concentrações de glicerol (A) e sacarose (B). Cultivos de 3 dias a 30 °C.

4.3.3 Análise titulométrica

Para análise da produção total de ácidos por titulometria, uma alíquota de 1 ml de cada tempo de fermentação (3, 6 e 9 dias) incluindo o tempo 0 (sem inóculo de *A. tubingensis* AN1257) foi retirada e acrescida de 19 ml de água destilada.

A titulação foi realizada com solução de Hidróxido de sódio (NaOH) [0,05 mol L⁻¹] para verificar a acidez do meio e determinar o potencial da linhagem *A. tubingensis* AN1257 para a secreção de ácido em cultivo submerso, em função da fonte de carbono. A análise titulométrica foi realizada em pHmetro automático SI Analytics.

4.3.4 Determinação, quantificação e análise dos ácidos orgânicos produzidos por *A. tubingensis* AN1257

As análises de HPLC foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu a um fluxo de 0,6 mL/min., temperatura do forno 60 °C, injeção de 5 µL e detecção a 220 nm. Foi utilizada coluna para ácidos orgânicos Rezex ROA 30 x 9. Amostras de 1,5 mL foram retiradas dos bioprocessos nos tempos de 0, 3, 6 e 9 dias de fermentação e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. Após esse tempo, foram retirados 150 µL do sobrenadante, os quais foram submetidos a uma diluição 1:10 em eluente ácido sulfúrico (H₂SO₄) [0,005N]. As amostras assim tratadas foram colocadas em *vials* e injetadas no cromatógrafo.

Para análise em ESims utilizou-se duas amostras que anteriormente haviam sido analisadas em HPLC e continham um pico com tempo de retenção de 19,6 minutos, detectado nos sobrenadantes dos processos suplementados com fonte de carbono glicerol e com sacarose. As duas amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. Em seguida, 150µL do sobrenadante foram diluídos 2x com H₂SO₄ [0,005N] e separados por HPLC para coleta do pico com tempo de retenção de 19,6 minutos. As amostras foram analisadas pelo Professor Rodinei Augusti, no Departamento de Química/UFMG, em ESims nas polaridades positiva e negativa, em fullscan entre 100 e 1500 m/z.

A cromatografia gasosa foi realizada em equipamento da marca Perkin com uma biblioteca NIST para comparação das análises feitas em HPLC e ESims. As amostras (GL) e (SG) coletadas dos bioprocessos suplementados com glicerol e sacarose após 9 dias de fermentação foram injetadas em CG-MS sem preparação prévia, com um tempo de corrida de 115 minutos e temperatura variando entre 80 a 310 °C. Foi utilizada coluna Elite-5 *crossbond* 5% diphenyl 95% dimethylpolysiloxane, marca Perkin Elmer, adequada para separação de compostos orgânicos apolares em geral. A temperatura do injetor foi ajustada em 220 °C e o fluxo a 0,3 mL/min.

4.4 Conversão de glicerol a L-asparaginase

A conversão de glicerol P.A. à L-asparaginase pela linhagem *Fusarium* sp. T22.2 foi investigada em meio líquido por processo estacionário. A forma de condução do processo foi definida a partir de resultados anteriores, em que se verificou a produção da enzima pela linhagem T22.2, cujos autores verificaram também a necessidade de ajuste e melhoramento da atividade enzimática produzida (GONÇALVES *et al.*, 2016).

4.4.1 Produção de L-asparaginase por processo estacionário em estado líquido

Os meios para a produção de L-asparaginase foram formulados de modo a conter: fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) [2 g L^{-1}]; cloreto de sódio (NaCl) [$0,5 \text{ g L}^{-1}$]; sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [$0,2 \text{ g L}^{-1}$]. A concentração de glicerol, de L-asparagina e o pH foram ajustados segundo definido por planejamento fatorial com o programa *Statistica* 7.0. A aplicação de planejamento fatorial permitiu gerar as condições para 8 bioprocessos que combinaram os valores máximos e mínimos das variáveis independentes analisadas (concentração de glicerol, de L-asparagina e pH) em uma análise multivariada. O principal objetivo dessa abordagem é evitar o excessivo número de etapas usualmente necessárias para melhorar um processo produtivo, quando se utiliza análise univariada. Além disso, a análise de uma única variável por vez, enquanto as demais são fixadas até que o melhor valor de cada parâmetro seja atingido, apresenta como desvantagem a impossibilidade de determinar as interações entre as variáveis, o que pode ser realizado com a abordagem aplicada no presente trabalho, conforme mostrado na Tabela 2. Os níveis mínimos e máximos de cada variável foram: 0,5 e 20 g L^{-1} para o glicerol; 0,5 e 10 g L^{-1} para L-asparagina; 5,5 e 6,5 para o pH.

Tabela 2 – Bioprocessos delineados por planejamento fatorial para a produção de L-asparaginase

Bioprocesso	Variáveis independentes		
	Glicerol (g . L ⁻¹)	L-asparagina (g . L ⁻¹)	pH
1	0,5	0,5	5,5
2	20	0,5	5,5
3	0,5	10	5,5
4	20	10	5,5
5	0,5	0,5	6,5
6	20	0,5	6,5
7	0,5	10	6,5
8	20	10	6,5

Os bioprocessos foram conduzidos por fermentação estacionária em estado líquido, em 60 ml de meio contido em frascos Erlenmeyer de 125 mL, conforme mostrado na Figura 7. Os esporos foram inoculados em cada meio de cultivo para uma concentração final de $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. A produção da atividade de L-asparaginase foi investigada em intervalos de 24 horas, no período de 48 a 120h de cultivo.

Foi realizada uma análise estatística para identificar o melhor nível de cada variável e suas interações a fim de dirigir o melhoramento da produção enzimática.

Figura 7 - Bioprocessos estacionários conduzidos com *Fusarium* sp. T22.2



As culturas em triplicata foram incubadas por 120 horas, a 30 °C. As amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas no período de 48 a 120 horas de cultivo e centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm. A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante.

4.4.2 Melhoria da produção de L-asparaginase

Após o planejamento fatorial e análise dos efeitos das variáveis, outros bioprocessos foram elaborados, utilizando-se uma combinação de diferentes concentrações de glicerol e L-asparagina, bem como pelo ajuste do pH, segundo os efeitos que foram determinados para cada variável e suas interações. Três novos meios foram elaborados de modo a conter: A) 25 g L⁻¹ de glicerol; 5 g L⁻¹ de L-asparagina; pH 8; B) 29,7 g . L⁻¹ de glicerol; 10 g L⁻¹ de L-asparagina; pH 7; C) 5 g L⁻¹ de glicerol; 15 g L⁻¹ de L-asparagina; pH 6. Os demais constituintes do meio não variaram (KH₂PO₄; NaCl; MgSO₄ 7H₂O). Os bioprocessos foram inoculados e conduzidos por fermentação estacionária em estado líquido como descrito acima. As culturas foram incubadas por 120 horas a 30 °C, com retirada de amostras em intervalos de 24 horas a partir de 72 horas de cultivo para determinação da atividade de L-asparaginase.

4.4.3 Verificação da produção de atividade de L-glutaminase

A produção de L-glutaminase por *Fusarium* sp. T22.2 foi investigada, visto que essa pode ser encontrada como atividade secundária inerente à L-asparaginase, a qual é indesejada no tratamento da LLA devido aos efeitos colaterais que causa, bem como pode ser produzida como enzima independente da primeira. O meio foi formulado de acordo com as concentrações do bioprocessos no qual houve maior produção de L-asparaginase, excetuando-se o substrato indutor que foi substituído: KH₂PO₄ [2 g L⁻¹]; NaCl [0,5 g L⁻¹]; MgSO₄ 7H₂O [0,2 g L⁻¹]; glicerol [5 g L⁻¹] e glutamina [15 g L⁻¹] pH 6. O inóculo de esporos teve uma concentração final de 1 x 10⁵ mL⁻¹.

As culturas em triplicata foram incubadas por 120 horas, a 30 °C. As amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas no período de 48 a 120 horas de cultivo e centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm. A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante.

4.4.4 Determinação da atividade de L-asparaginase e L-glutaminase

As atividades de L-asparaginase e L-glutaminase foram determinadas separadamente conforme metodologia adaptada de Chow e Ting (2015). A mistura reacional foi preparada em tubos de polipropileno de 1,5 mL, nos quais foram adicionados 0,1 mL de tampão Tris. HCl [1 mol L⁻¹] pH 7 mais 0,2 mL de solução de L-asparagina ou L-glutamina [8 mmol L⁻¹] e

0,1 mL de água destilada. Após pré-incubação a 37 °C durante 5 minutos, foram adicionados 0,1 mL do sobrenadante das culturas conduzidas para produção das enzimas L-asparaginase e L-glutaminase em tubos diferentes, seguindo-se uma incubação de 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida com 0,1 mL de ácido tricloroacético (TCA) [1,5 mol L⁻¹]. Amostras controle foram preparadas pela adição de ácido tricloroacético à mistura antes da adição do sobrenadante contendo as enzimas, de modo a se obter o tempo zero de reação.

Uma alíquota de 0,1 mL foi coletada de cada reação e adicionada a 0,45 mL de reagente de Nessler mais 0,6 mL de água destilada para determinar a quantidade de amônia formada pela hidrólise de L-asparagina e L-glutamina. Após incubação a 28 °C durante 15 minutos, a absorvância foi determinada a 450 nm contra um branco preparado como a reação, exceto pela substituição do sobrenadante por água destilada. A concentração de amônia liberada na reação foi calculada conforme uma curva de calibração, considerando a diferença entre a absorvância final (30 minutos de reação) e a inicial (tempo zero). A atividade de L-asparaginase e L-glutaminase foi determinada em Unidades Internacionais (UI), que corresponde a quantidade de enzima que libera 1 µmol de amônia por minuto por mL de amostra, nas condições de reação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conversão de glicerol e sacarose a ácidos orgânicos

A investigação da produção de ácidos orgânicos por *A. tubingensis* AN1257 em comparação com a linhagem *A. niger* 10v10 demonstrou que a fonte de carbono sacarose foi melhor para o acúmulo de ácidos totais, bem como os resultados alcançados direcionaram a avaliação da produção de ácidos orgânicos em processo submerso, conforme resultados que serão apresentados a seguir.

5.1.1 Triagem da produção de ácidos orgânicos em meio sólido

A variação de pH e utilização de glicerol ou sacarose como fonte de carbono nas culturas de triagem foram feitas para verificar o potencial de produção pelos fungos *A. tubingensis* AN1257 e *A. niger* 10v10. Segundo Max *et al.* (2010) e Yang *et al.* (2017) diferentes espécies de *Aspergillus* como *A. wenti*, *A. foetidus*, *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. fonsecaeus*, *A. phoenicis* e *A. carbonarius* vêm se mostrando bons produtores de ácido cítrico e outros ácidos orgânicos. Esse fato revela a possibilidade de outras espécies como *A. tubingensis* serem também produtoras de ácidos.

As linhagens AN1257 e 10v10 foram cultivadas em meio sólido para acidogênese pH 4 e após 4 e 7 dias de cultivo foi visualizada a acidez secretada pela diferença de cor entre o halo amarelo ao redor da colônia contra o meio de coloração esverdeada. Tanto *A. tubingensis* AN1257 quanto *A. niger* 10v10 mostraram boa secreção de ácidos em meio sólido. Porém, após 4 dias de cultivo pode-se observar um maior halo de acidogênese no cultivo com glicerol em AN1257 em relação ao mesmo tempo de cultivo e mesma fonte de carbono com 10v10. Ainda no tempo de 4 dias, é visualizado uma maior secreção de ácidos em culturas suplementadas com sacarose em ambas as linhagens. Após 7 dias de cultivo, a secreção de ácido pelas linhagens foi tão intensa que todo o meio foi acidificado. (FIG. 8).

Figura 8 – Cultivo de *Aspergillus tubingensis* AN1257 e *Aspergillus niger* 10v10 para avaliação da acidogênese em meio sólido suplementado com sacarose e glicerol em pH4



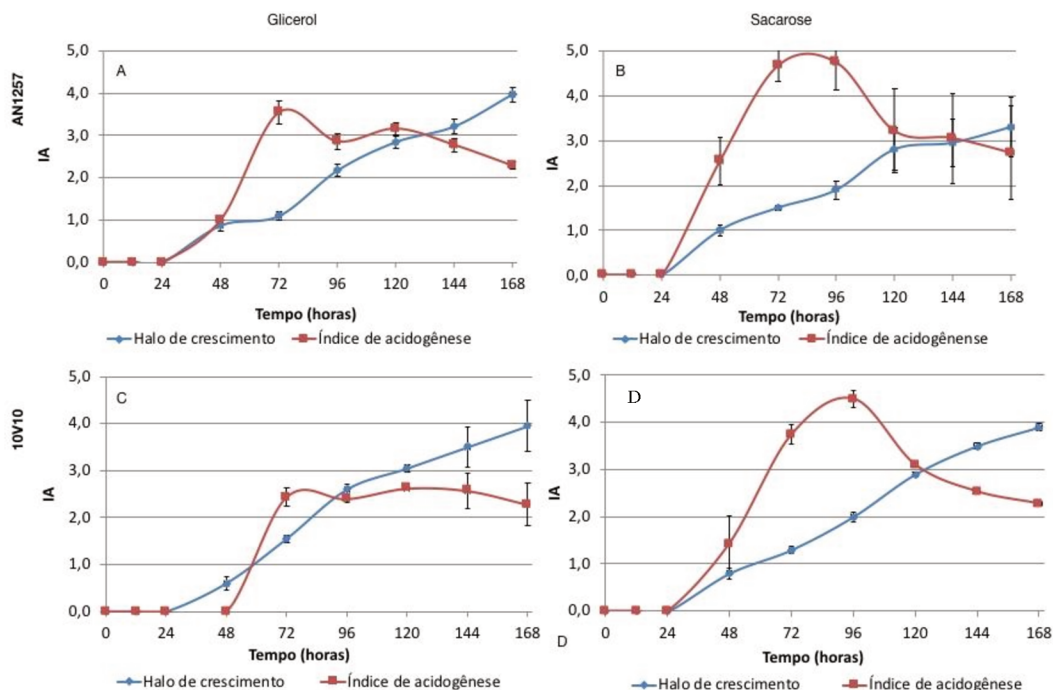
O meio foi suplementado com glicerol e sacarose como fontes de carbono, sendo o pH ajustado para 4. As culturas foram inoculadas com 50 conídios no centro de cada placa e incubadas a 30 °C. Foram realizadas mensurações diárias para determinar o crescimento radial e o diâmetro do halo ácido. São mostradas culturas de 4 e 7 dias.

Dezam *et al.* (2017) triaram 6 gêneros de fungos quanto à produção de ácidos orgânicos por fermentação em estado sólido, utilizando sacarose como fonte de carbono e verde de bromocresol como indicador do pH. Nos estudos desses autores apenas os gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* foram adequados para a secreção de ácido.

No presente trabalho, podemos perceber o potencial para produção de ácidos orgânicos do fungo *Aspergillus tubingensis* AN1257 já que ele mostrou ter secretado mais ácidos que o fungo padrão, *Aspergillus niger* 10v10.

Após determinar o diâmetro da colônia e os halos de acidez, o índice de acidogênese foi calculado para cada tempo de cultivo. As curvas de crescimento radial e IA das linhagens AN1257 e 10v10 em meio suplementados com glicerol e sacarose e em pH 4 são mostradas na Figura 9.

Figura 9 – Crescimento e índice de acidogênese de *Aspergillus tubingensis* AN1257 e *Aspergillus niger* 10v10 em meios ajustados para pH 4



O meio foi suplementado com glicerol (A, C) ou sacarose (B, D) como fonte de carbono, sendo o pH ajustado para 4. As culturas das linhagens *A. tubingensis* AN1257 (A, B) e *A. niger* 10v10 (C, D) foram incubadas a 30 °C e observadas diariamente para determinar o crescimento radial e o diâmetro do halo ácido.

As linhagens *A. tubingensis* AN1257 e *A. niger* 10v10 iniciaram crescimento radial mensurável após 24 horas. Ambas cresceram até 168 horas de cultivo, mostrando boa adaptação às condições utilizadas para cultivo e secreção de ácido.

O máximo IA produzido pela linhagem *A. tubingensis* AN1257 foi verificado após 72 horas de cultivo, tanto no meio suplementado com glicerol quanto no meio suplementado com sacarose (FIG. 9). Porém, o IA obtido no meio suplementado com sacarose foi maior do que o obtido no meio com glicerol, o que é compreensível visto que a primeira constitui uma fonte de carbono preferencial dos fungos filamentosos, corroborando os dados da literatura que mostram que elevadas concentrações de açúcares de rápida assimilação são ideais para a produção de ácidos orgânicos (MAX *et al.*, 2010). No entanto, o glicerol também mostrou ser uma boa fonte de carbono alternativa para o crescimento e produção de ácidos orgânicos, visto que o IA de aproximadamente 3,5 obtido nessas condições é indicativo do potencial que a linhagem apresenta para a secreção de ácido.

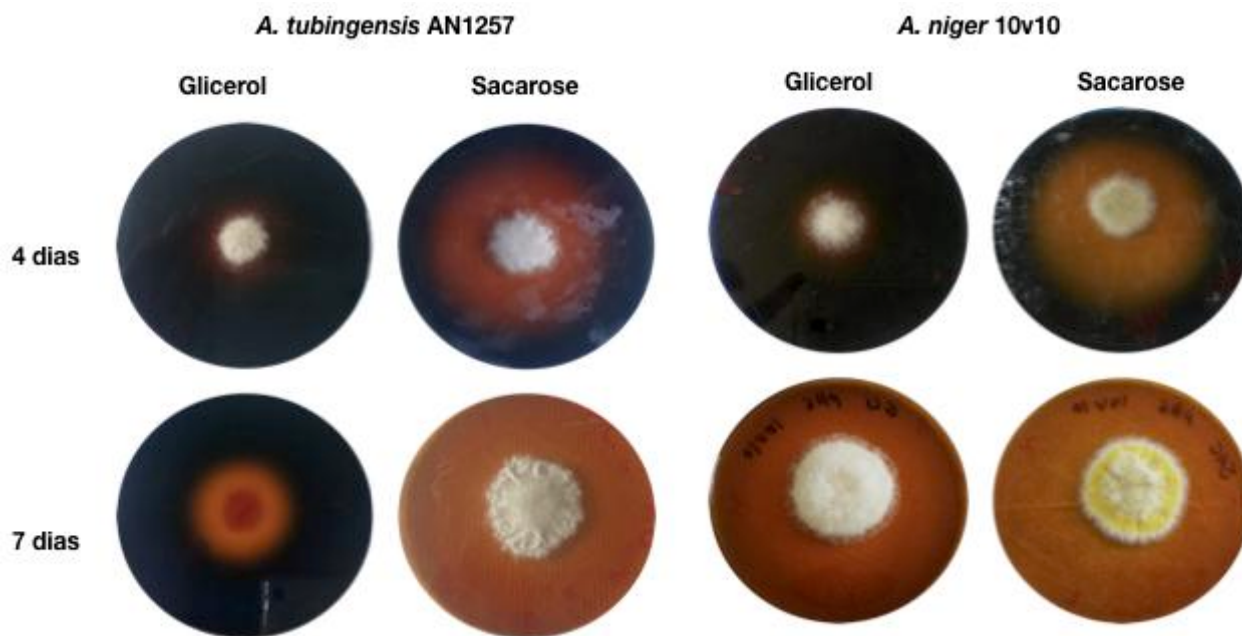
Como se observa na Figura 9C, em meio suplementado com glicerol o perfil de IA da linhagem *A. niger* 10v10 difere do apresentado pela linhagem *A. tubingensis* AN1257 quando

cultivada em pH 4, que é o pH ideal para o início da produção de ácido cítrico. Nessa condição, *A. niger* 10v10 produz IA de aproximadamente 2,5 após 72 horas, inferior ao IA de aproximadamente 3,5 produzido por *A. tubingensis* AN1257 após o mesmo tempo e nas mesmas condições de cultivo.

Mesmo em meio suplementado com sacarose como fonte de carbono, a acidogênese da linhagem *A. niger* 10v10 foi inferior à da linhagem *A. tubingensis* AN1257. Nessas condições houve um atraso na máxima de produção de ácido pela linhagem padrão (96h), se comparada com a linhagem AN1257, que apresentou máxima após 72 horas (FIGs. 9B, 9D).

O cultivo das linhagens *A. tubingensis* AN1257 e *A. niger* 10v10 também foi realizado em meio suplementado com glicerol e sacarose em pH 6 para verificar a influência na acidogênese e, assim, verificar a importância dessa variável para o desenvolvimento do processo produtivo. Como se pode verificar na Figura 10, a elevação do pH de 4 para 6 foi prejudicial para a acidogênese da linhagem *A. tubingensis* AN1257 em meio suplementado com glicerol.

Figura 10 – Comparação da acidogênese produzida por *Aspergillus tubingensis* AN1257 e *Aspergillus niger* 10v10 em função da fonte de carbono em meio ajustado para pH 6

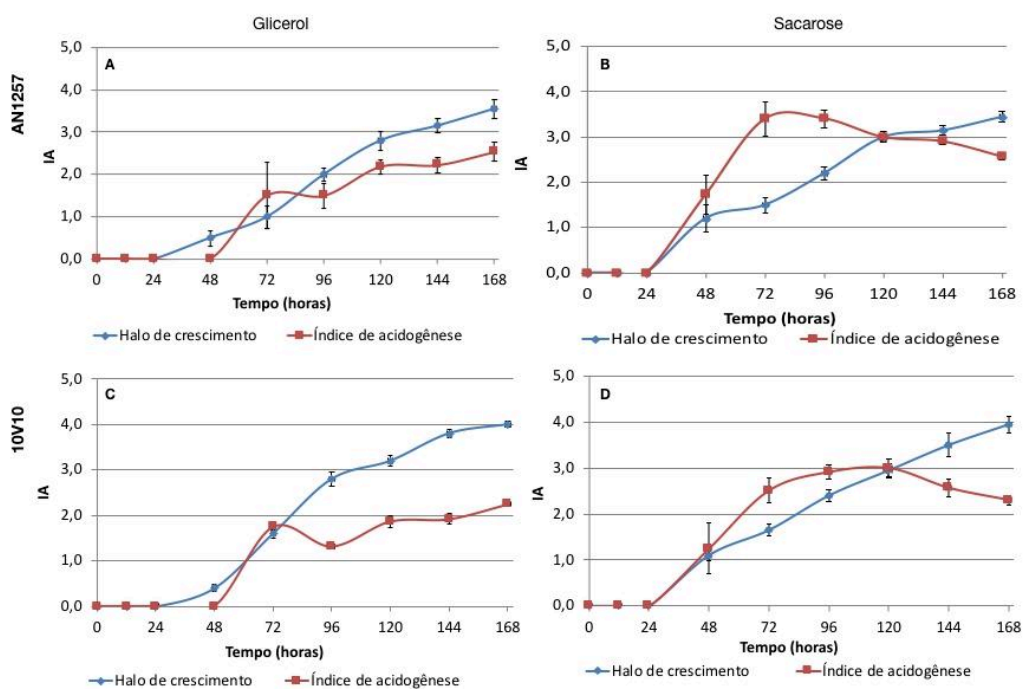


Os meios foram suplementados com glicerol ou sacarose como fonte de carbono, sendo o pH ajustado para 6. As culturas foram inoculadas com 50 conídios no centro de cada placa, incubadas a 30 °C e observadas diariamente para determinar o crescimento radial e o diâmetro do halo ácido.

O ajuste do meio em pH inicial igual a 6 diminui o índice de acidogênese nas culturas de 4 dias comparadas com aquelas em pH 4. Após 7 dias, a linhagem 10v10 cultivada em sacarose acidificou completamente o meio, da mesma forma que ocorreu quando cultivada em pH 4. Porém, no meio suplementado com glicerol, o halo de acidogênese foi menos intenso do que os observados nas culturas das linhagens 10v10 e AN1257 preparadas em meio contendo glicerol e ajustados em pH 4.

As curvas de crescimento radial e de IA em meio ajustado para pH 6 são mostradas na Figura 11. Observa-se a redução da acidogênese pela linhagem *A. tubingensis* AN1257 quanto cultivada em meio ajustado com pH inicial de 6 (FIG. 11) ao se comparar com sua acidogênese em pH inicial igual a 4 (FIG.9)

Figura 11 - Crescimento e índice de acidogênese de *Aspergillus tubingensis* AN1257 e *Aspergillus niger* 10v10 em meios ajustados para pH 6



O meio foi suplementado com glicerol (A, C) ou sacarose (B, D) como fonte de carbono, sendo o pH ajustado para 6. As culturas das linhagens *A. tubingensis* AN1257 (A, B) e *A. niger* 10v10 (C, D) foram incubadas a 30 °C e observadas diariamente para determinar o crescimento radial e o diâmetro do halo ácido.

No meio suplementado com sacarose e em pH 6, a linhagem AN1257 gerou o máximo de IA após 72 horas, à semelhança do que havia sido verificado em meio ajustado com pH 4, apesar da redução do IA (FIG. 9, FIG. 11). Enquanto o IA atingiu valor acima de 4,0 após 72 horas de cultivo em meio suplementado com sacarose e em pH 4, o ajuste do meio para pH 6 reduziu o IA para cerca de 3,5. Contudo, a linhagem AN1257 foi capaz de secretar elevada

acidez após 7 dias de cultivo em meio suplementado com sacarose, mesmo em pH 6,0 em relação ao 10v10 (FIG. 10). As curvas de IA em função do tempo de cultivo, mostram que nas culturas suplementadas com sacarose, mesmo em meio ajustado com pH inicial igual a 6,0, *A. tubingensis* AN1257 manteve razão de secreção de ácido maior do que a da linhagem 10v10 (FIG 11). Esses resultados mostram que a linhagem AN1257 pode ser boa para converter sacarose a ácidos orgânicos, em meio ácido ou mais próximo da neutralidade. Porém, no meio suplementado com glicerol e ajustado com pH 6, o impacto sobre a acidogênese foi mais marcante, pois, além da redução do IA, houve também um atraso na obtenção do máximo.

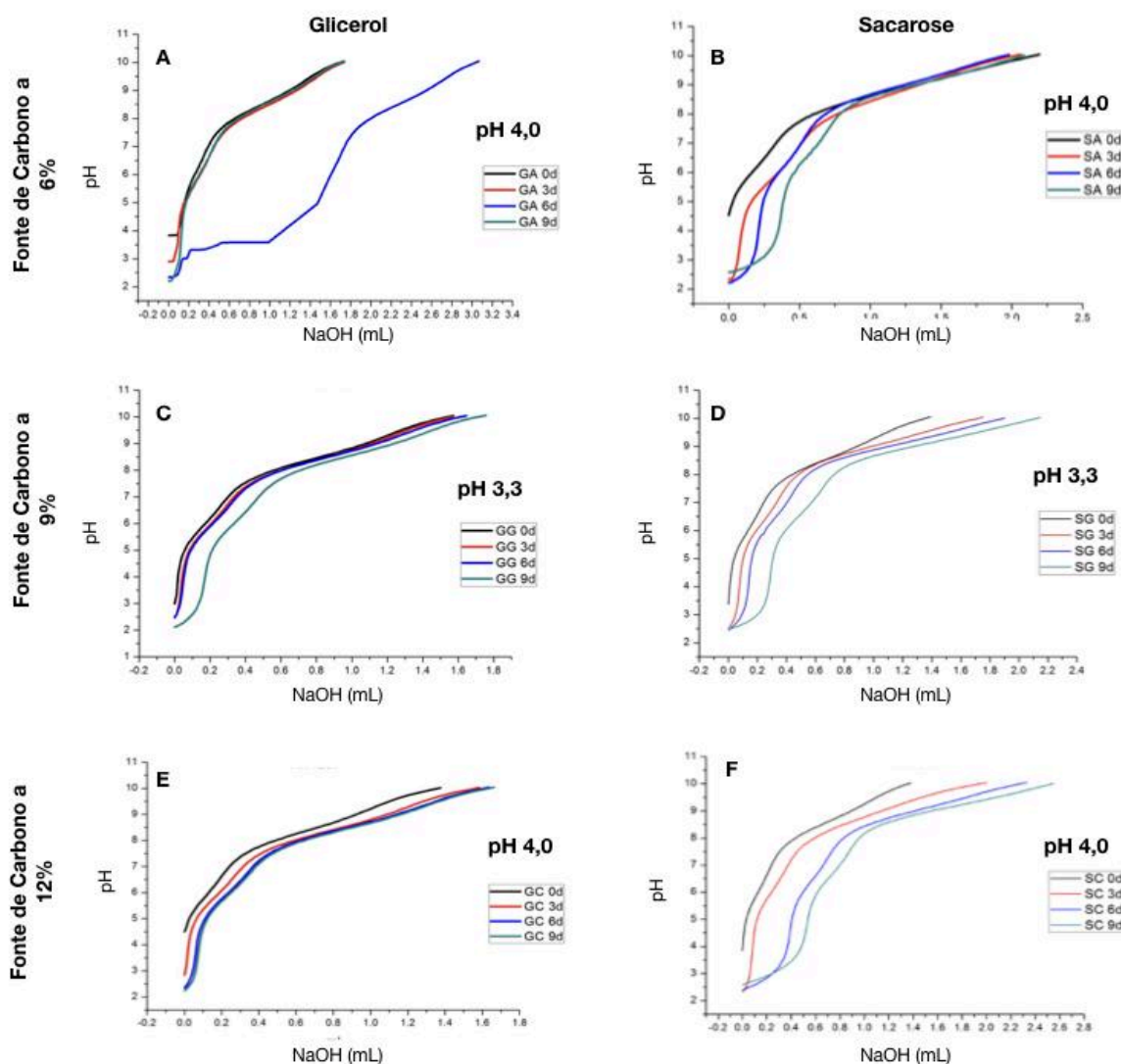
A curva de crescimento e o IA determinado nas culturas da linhagem *A. niger* 10v10 ao longo do tempo também evidenciam o quanto a acidogênese foi prejudicada pelo ajuste do pH em 6, quando comparada com as culturas conduzidas em pH 4 (FIGs. 8 e 11). A influência do pH também foi evidente para a linhagem 10v10 cultivada em meio suplementado com glicerol, com redução do IA de cerca de 2,5 para aproximadamente 2,0 pelo ajuste do pH em 6 ao invés de 4. Porém, como se pôde observar, a acidogênese da linhagem 10v10 sofreu mais influência da fonte de carbono que do pH, visto que, quando cultivada em pH 4, a substituição da sacarose por glicerol reduz o IA de aproximadamente 4,5 para 2,5, conforme se observa na Figura 9. O aumento do pH inicial das culturas da linhagem 10v10 em meio suplementado com sacarose reduziu o IA de 4,5 para cerca de 3,0 (FIG.s 9 e 11).

A comparação das curvas de formação de IA das duas espécies indica o potencial de *A. tubingensis* AN1257 como produtor de ácido, visto que seu índice de acidogênese em meio suplementado com sacarose e em pH 6 foi superior ao apresentado pela linhagem *A. niger* 10v10, um tradicional produtor de ácido cítrico (SHOW *et al.*, 2015). A comparação da acidogênese produzida pelas duas espécies em meio suplementado com glicerol e em pH 4, mostrou que *A. tubingensis* AN1257 produziu IA maior do que o produzido por *A. niger* 10v10. O IA produzido pela linhagem AN1257 ao longo do tempo de cultivo, que alcançou um valor aproximado de 3,5 após 72 horas no meio suplementado com glicerol e em pH 4, bem como próximo de 5,0 após 72 horas no meio suplementado com sacarose e pH 4, foi grande indicativo do potencial dessa linhagem como produtora de ácidos orgânicos utilizando ambas as fontes de carbono. Dessa forma, os experimentos de triagem permitiram verificar que a linhagem *A. tubingensis* AN1257 apresenta potencial para a produção de ácido pela conversão de glicerol e de sacarose, bem como existe um efeito do pH associado à fonte de carbono.

5.1.2 Produção de ácidos orgânicos por processo submerso

Após os experimentos de triagem e a confirmação da linhagem *A. tubingensis* AN1257 como potencial produtora de ácidos totais, tanto em meio suplementado com glicerol, quanto em meio suplementado com sacarose, foram conduzidos os bioprocessos delineados estatisticamente, conforme condições descritas na Tabela 1. Os sobrenadantes dos processos foram utilizados para titulação potenciométrica, sendo que a comparação do efeito das fontes de carbono glicerol e sacarose sobre produção total de ácidos estão mostradas na Figura 12.

Figura 12 – Produção de ácidos totais por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processo submerso em função da fonte de carbono e pH ácido



As análises titulométricas foram conduzidas com NaOH 0,05 mol L⁻¹ após coleta do sobrenadante dos cultivos de *A. tubingensis* AN1257 em meios suplementados com glicerol ou sacarose como fonte de carbono, sendo o pH ajustado para 4 ou 3,3, como indicado na figura. A fonte de carbono foi ajustada para 6% nos bioprocessos GA e SA (A, B), 9% nos bioprocessos GG e SG (C, D) ou 12% nos bioprocessos GC e SC (E, F). G, glicerol; S, sacarose. Foram analisados os sobrenadantes de culturas após 0 (controle), 3, 6 e 9 dias de cultivo.

Os bioprocessos ajustados com fonte de carbono (glicerol ou sacarose) a 6% e pH 4, correspondem às condições do Bioprocesso A (TAB. 1). Ao se comparar o pH determinado nas amostras coletadas após 0 (controle), 3, 6 e 9 dias de cultivo antes do início do processo titulométrico, ou seja, antes da adição de NaOH, é possível verificar a tendência do pH ser reduzido para 2 tanto em amostras com glicerol como com sacarose, evidenciando a secreção de ácido pela linhagem AN1257 também em meio líquido, à semelhança do que havia sido verificado em meio sólido. Porém, o perfil titulométrico das amostras coletadas após 6 dias usando glicerol como fonte de carbono foi diferente das demais, mostrando forte efeito tamponante. Ao se verificar o platô da curva de titulação (FIG. 12A) da cultura de 6 dias é possível inferir sobre a possibilidade da secreção de um ácido ou outro produto com pK_a de aproximadamente 3,5 o que é próximo ao pK_a da primeira ionização dos ácidos cítrico ($pK_{a1} = 3,13$), tartárico ($pK_{a1} = 3,03$), fumárico ($pK_{a1} = 3,02$) e málico ($pK_{a1} = 3,4$). Entretanto, como se trata de uma mistura de produtos é difícil presumir com base apenas na análise titulométrica qual dentre esses ou outros ácidos e produtos foram produzidos. O perfil titulométrico da amostra coletada após 9 dias de cultivo, indica que o produto responsável pelo tamponamento ora discutido, foi possivelmente consumido.

Quando é utilizada sacarose como fonte de carbono nas mesmas condições do Bioprocesso A (fonte de carbono a 6% e pH inicial em 4), o perfil titulométrico das amostras coletadas após 3, 6 e 9 dias de cultivo apresenta aumento progressivo da resistência à alcalinização, requerendo maiores volumes de NaOH para elevação do pH, o que indica a presença de produtos ácidos (FIG.12B), mas não se observando o mesmo perfil obtido e o forte efeito tamponante verificado na amostra proveniente do cultivo de 6 dias em meio suplementado com glicerol (FIG. 12A).

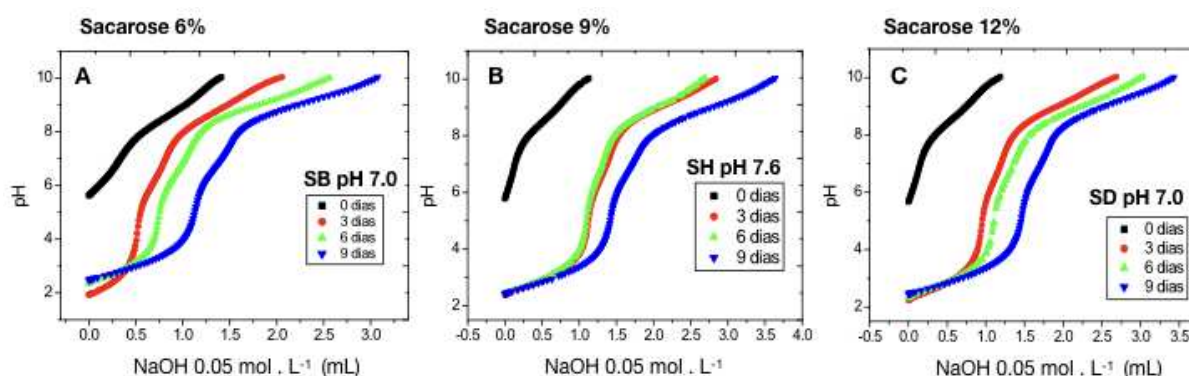
Aplicando-se as condições do Bioprocesso G delineado por CCD (TAB. 1), que corresponde ao ponto axial inferior da variável pH e que foi ajustado para conter fonte de carbono glicerol ou sacarose a 9% em pH 3,37, mantém-se a acidificação do meio ao longo do tempo de cultivo (FIG. 12C, D). Nas condições dos bioprocessos G (TAB. 1), verifica-se que a cultura de 9 dias apresentou sobrenadante com maior resistência à elevação do pH pela adição de NaOH, especialmente nos cultivos suplementados com sacarose (FIG. 12D).

Quando aumentada a concentração de glicerol e sacarose para 12% em meio ajustado para pH 4, condição correspondente ao bioprocessos C delineado por CCD (TAB. 1), também se verifica a tendência de acidificação do meio (FIG. 12E, 12F), à semelhança do que se verificou nas amostras provenientes dos meios ajustados com fonte de carbono a 9% (FIG. 12C, 12D).

A titulação das amostras das culturas suplementadas com sacarose a 12% evidencia o aumento do efeito tamponante em função do tempo de cultivo, se comparada com o tempo 0 (controle) como se verifica na Figura 12F. Embora após 3, 6 e 9 dias o pH das culturas tenha sido reduzido em comparação ao tempo zero, o efeito mais marcante é o da resistência à titulação com NaOH, que se intensifica progressivamente nas culturas de 6 dias e especialmente nas de 9 dias (FIG. 12F). Porém, a quantidade de ácido produzido nos meios suplementados com glicerol é pequena, visto que ao longo do tempo, o perfil titulométrico mostrado indica pouca resistência à elevação do pH quando ocorre adição de NaOH (FIG. 12E).

A produção de ácidos totais por *A. tubingensis* AN1257 em processo submerso também foi investigada em pH próximo à neutralidade, tendo em vista os resultados observados para a avaliação da acidogênese em meio sólido, os quais mostraram que em meio suplementado com sacarose, a linhagem ainda apresentava forte tendência de secreção de ácidos totais mesmo em pH inicial ajustado para 6,0. Em processos submersos suplementados com glicerol e pH 7,0, não houve indício de boa produção de ácidos, conforme determinado por análise titulométrica (dados não mostrados). Porém, nos bioprocessos conduzidos com sacarose como fonte de carbono e meios ajustados para pH 7,0, a análise titulométrica dos filtrados confirmou a linhagem AN1257 como boa produtora de ácido, especialmente quando a concentração de sacarose era elevada (12%), como se observa na Figura 13.

Figura 13 – Produção de ácidos totais por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processo submerso em função da concentração de sacarose em pH próximo à neutralidade



As análises titulométricas foram conduzidas com NaOH 0,05 mol L⁻¹ após coleta do sobrenadante dos cultivos de *A. tubingensis* AN1257 em meios suplementados com sacarose como fonte de carbono, sendo o pH ajustado para valores neutros ou próximos à neutralidade, como indicado na figura. A fonte de carbono foi ajustada para 6%, 9% ou 12% nos bioprocessos SB, SH e SD, respectivamente. Foram analisados os sobrenadantes de culturas após 0 (controle), 3, 6 e 9 dias de cultivo.

A determinação potenciométrica do pH nas amostras coletadas no tempo zero (controle) de cada cultura preparada em meio suplementado com sacarose mostrou que o pH inicial foi diminuído para valores inferiores a pH 3,0, nas amostras coletadas após 3, 6 e 9 dias de cultivo, como se pode observar a partir das curvas de titulação antes da adição de NaOH (FIG. 13). Essas comparações evidenciam a secreção de ácido pela linhagem AN1257 após 3 dias de cultivo em quaisquer dos processos submersos suplementados com sacarose, semelhantemente aos resultados obtidos em meio sólido. Independentemente da quantidade de sacarose nos meios, o pH das amostras decresceu após 3, 6 e 9 dias de cultivo em comparação com o pH inicial, evidenciando a presença de produtos ácidos (FIG. 13). As amostras controle (tempo zero) mostram curvas de titulação com duas regiões tamponantes, uma próxima a pH 6,0, que pode ser devida à formação de carbonatos, e outra próxima a pH 9,0, devida à presença de sais de fosfato e amônio (FIG. 13).

Ao se comparar os processos conduzidos em meio suplementado com sacarose 6% e variando-se o pH de 4 para 7, ou seja, comparando-se os processos SB (FIG. 13A) e SA (FIG. 12B) verifica-se que o aumento do pH favoreceu a produção de ácido pela linhagem AN1257 em processo submerso.

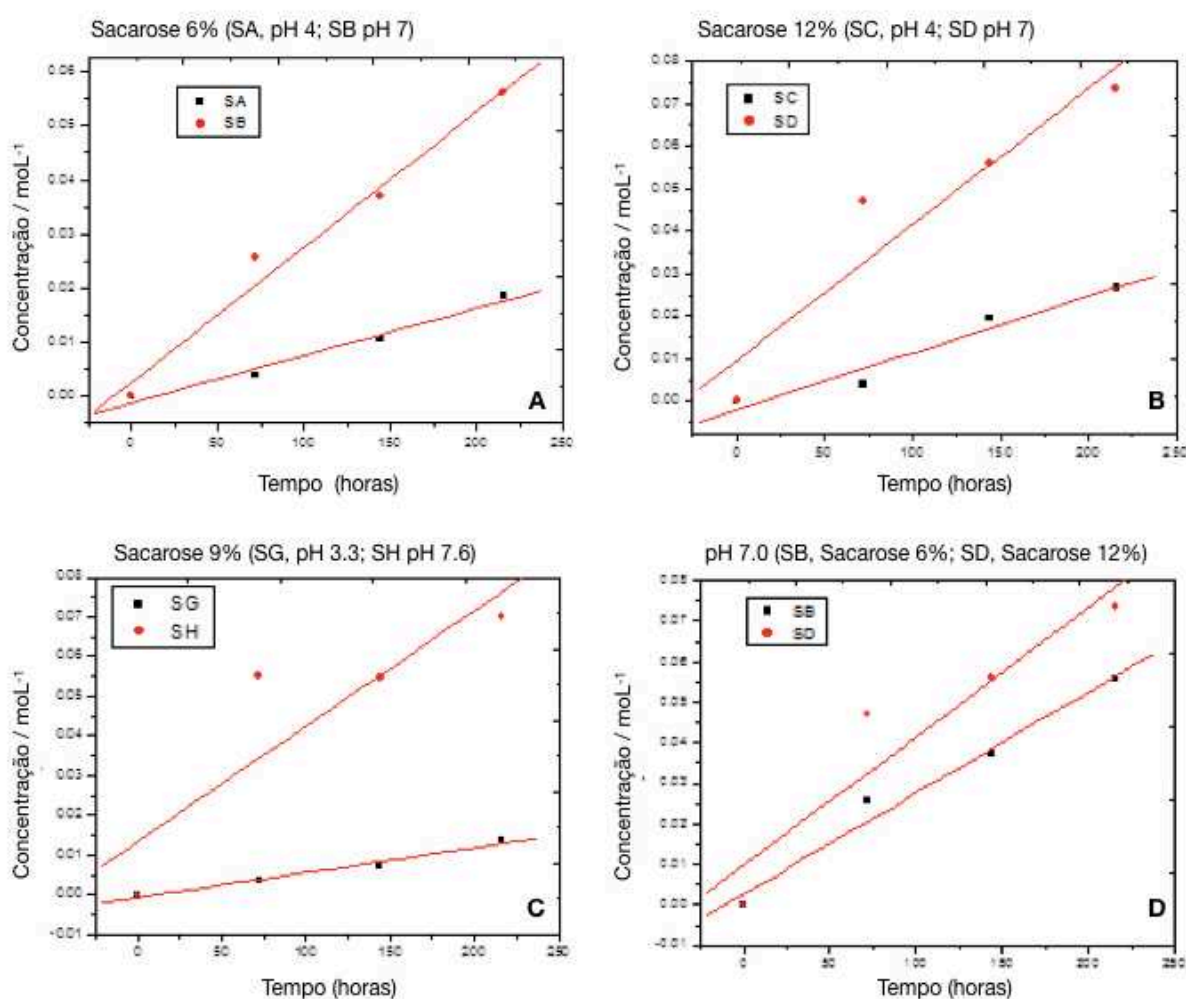
A análise das amostras coletadas dos bioprocessos SG (sacarose 9%, pH inicial 3,37) (FIG. 12D) e SH (sacarose 9%, pH inicial 7,6) (FIG. 13B) mostra que após 3 dias de cultivo, o pH do meio foi reduzido para aproximadamente 2,5. Quando se compara as curvas titulométricas realizadas com amostras dos processos SH (FIG. 13B) e SG (FIG. 12D) ambos suplementados com sacarose 9%, mas diferindo pelo ajuste do pH inicial, evidencia-se que o ajuste do pH em 7,6 favoreceu fortemente a produção de ácidos totais por *A. tubingensis* AN1257, como mostra o efeito tamponante na curva de titulação. Tal efeito se confirma e intensifica quando a concentração de sacarose é ajustada em 12% e pH 7,0 (Processo SD) (FIG. 13C) ao se comparar com a curva de titulação do Processo SC (FIG. 12F) que foi ajustado com a sacarose 12%, porém com pH 4.

Após o crescimento fúngico e secreção de ácido nos processos submersos, o pH do meio diminuiu e o volume de equivalência aumentou de 0,03 mL (3 dias) para 0,3 mL (6 dias) e para 0,5 mL (9 dias) como visto nas curvas dos bioprocessos SC, ajustados inicialmente para pH 4,0 (FIG. 12F). Mas, quando a concentração de sacarose foi ajustada para 12% e o pH inicial em 7,0 no bioprocessos SD, a produção de ácido aumentou após 6 e 9 dias de cultivo, uma vez que essas amostras apresentaram resistência maior à elevação do pH, com aumento do efeito tamponante (FIG. 13C). Esses resultados indicam que elevando-se a concentração de sacarose para 12% e o pH inicial para 7,0, aumenta a produção de ácido pela linhagem

AN1257. É importante considerar que a germinação conidial em *Aspergillus* é influenciada pelo pH inicial, com valores melhores variando de 4,0 a 7,0. Assim, enquanto a acidificação do meio e a secreção de ácido foi verificada em todas as culturas, a quantidade total pode variar em função de razões metabólicas e também pela germinação e pelo crescimento.

Aplicando-se o método da derivada, foi possível determinar o volume de NaOH (0.05 mol L^{-1}) necessário para neutralizar os ácidos produzidos e, dessa forma, quantificar a quantidade total de ácido (FIG. 14).

Figura 14 – Quantificação dos ácidos totais produzidos por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processo submerso em função da concentração de sacarose e do pH



As culturas foram incubadas a 30°C for 3 (72 h), 6 (144 h), e 9 dias (216 h). Amostras foram coletadas, tituladas contra NaOH 0.05 mol L^{-1} e a quantidade de ácido total foi estimada pelo método da derivada.

A comparação gráfica dos processos SA e SB, que foram ambos suplementados com sacarose a 6%, mas ajustados para pH 4 e 7, respectivamente, permitiu verificar que a produção de ácidos foi maior em pH 7,0 ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) do que em pH 4,0 ($8,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), como mostrado na Figura 14. O mesmo ocorre quando a concentração de sacarose é

aumentada para 9 e 12%, confirmando as interpretações dos gráficos das curvas titulométricas (FIGs. 12 e 13). A análise dos Bioprocessos SC e SD, que foram suplementados com sacarose a 12%, mostra duas vezes mais produção de ácido em pH 7,0 (Bioprocesso SD, $3,2 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹) do que em pH 4,0 (Bioprocesso SC, $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹). Essas análises indicam que *A. tubingensis* AN1257 é mais adequado para a produção de ácido em pHs mais próximos à neutralidade (FIG. 14). Tal tendência foi confirmada ao se investigar a produção de ácido nos bioprocessos ajustados com os pontos axiais da variável pH (Bioprocesso SG, pH 3,3 e Bioprocesso SH, pH 7,6), ambos suplementados com 9% de sacarose (FIG. 14). A menor quantidade de ácido foi obtida no Bioprocesso SG.

Uma vez definido o pH neutro como a melhor condição para a produção de ácido por *A. tubingensis* AN1257, o efeito da concentração de sacarose também foi analisado pela comparação do Bioprocesso SB (sacarose 6%) com o Bioprocesso SD (sacarose 12%). Como mostra a Figura 14, o aumento da concentração de sacarose eleva a produção de ácido, a qual atinge $3,2 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ no Bioprocesso SD. Tendo sido verificada a produção de ácidos totais em processos submersos pela linhagem AN1257, foram conduzidas as análises por HPLC, CG e eletrospray para identificação e quantificação desses produtos.

5.1.3 Determinação, quantificação e análise dos ácidos orgânicos produzidos por Aspergillus tubingensis AN1257

A análise por HPLC nos sobrenadantes das culturas dos bioprocessos delineados por DCC evidenciou a presença de ácidos orgânicos consistentes com os padrões existentes, como: ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido láctico, ácido tartárico, além de glicerol e dos açúcares glicose e frutose. Não foram detectados picos de ácido acético e butírico.

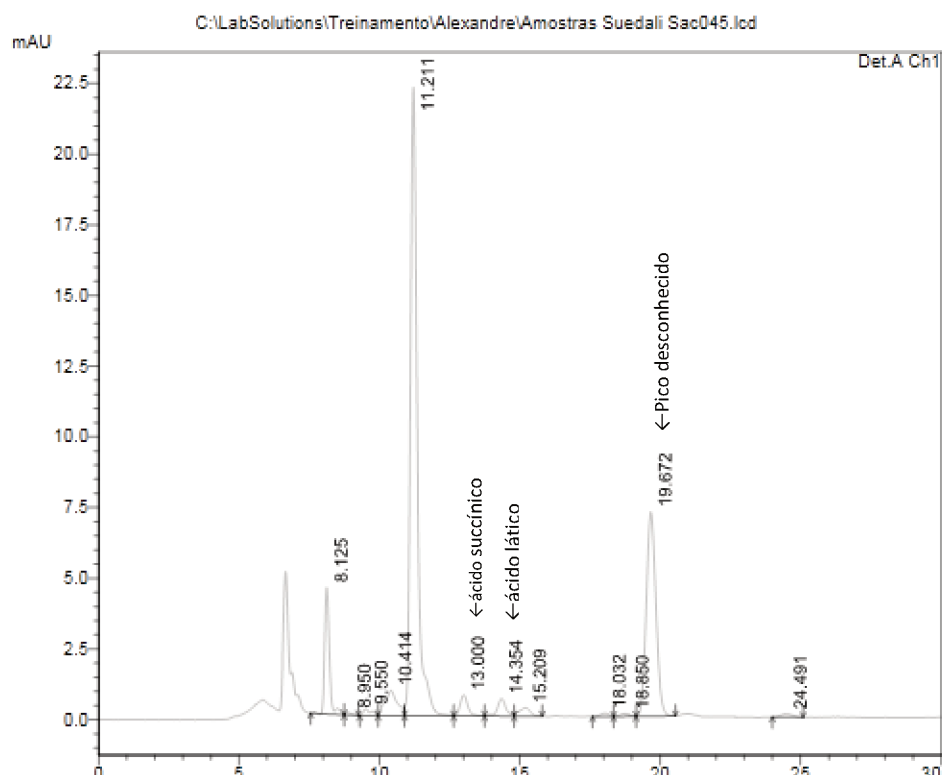
Na figura 15 são mostrados alguns picos de ácidos orgânicos relacionados com seus tempos de retenção (TR) como ácido succínico (TR 13 min.) e ácido láctico (TR 14,3 min.) Foi detectado um pico desconhecido (TR 19,6 min.) que aparece em algumas amostras provenientes de culturas de 6 dias e em todas amostras coletadas após 9 dias de cultivo em bioprocessos conduzidos com glicerol como fonte de carbono. O mesmo pico com TR de 19,6 min. foi detectado no sobrenadante de todas as amostras coletadas dos bioprocessos suplementados com sacarose, após 3 a 9 dias de cultivo.

Figura 15 – Análise por HPLC para identificação dos ácidos orgânicos produzidos por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processo submerso suplementado com sacarose em pH 5,5

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : C:\LabSolutions\Treinamento\Alexandre\Amostras Suedali Sac045.lcd
 : Admin
 Sample Name : Amostras Suedali Sac045
 Sample ID : Amostras Suedali Sac-0045
 Tray# : 1
 Vial# : 9
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : Amostras Suedali Sac045.lcd
 Method File Name : ác orgânicos e alcoois Rezex ROA.lcm
 Batch File Name : GabiM.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 16/5/2017 03:50:14
 Data Processed : 16/5/2017 05:20:18

<Chromatogram>

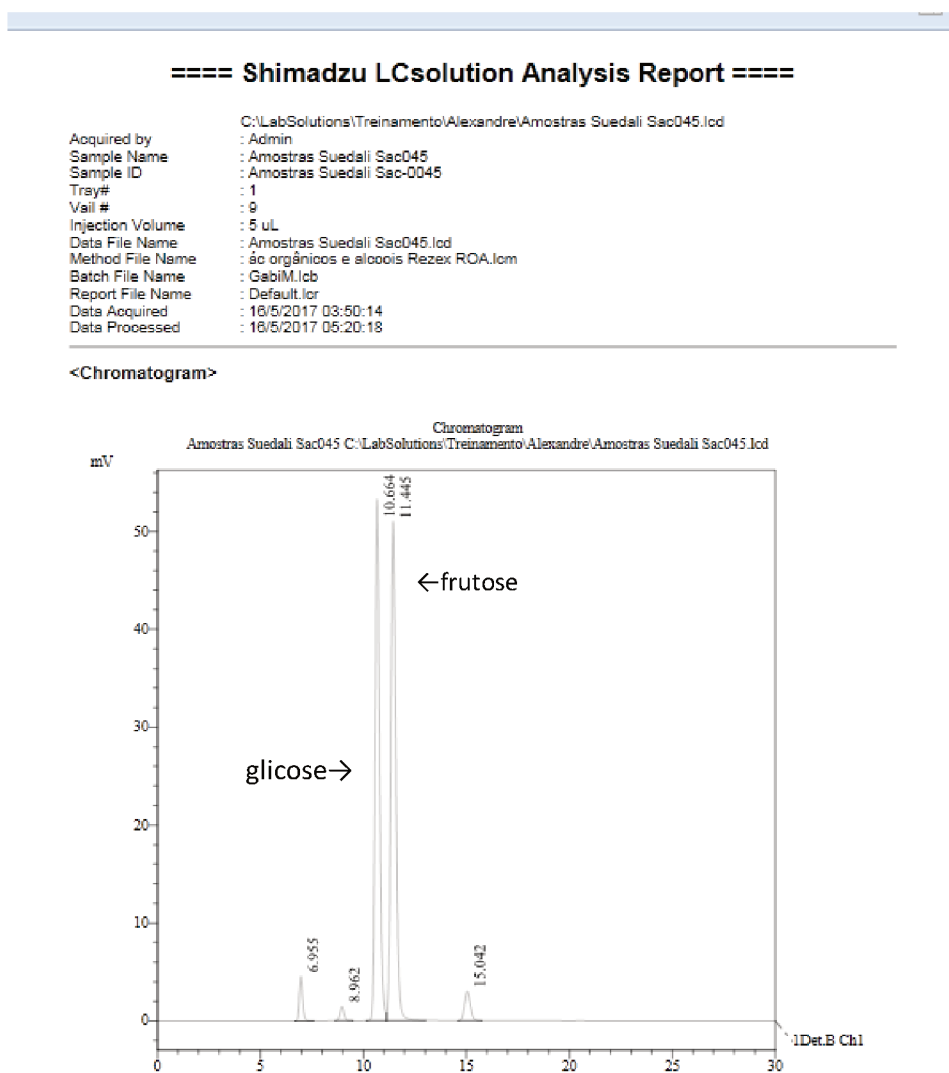


A amostra analisada foi coletada de bioprocesso conduzido com *A. tubingensis* AN1257 inoculado em meio suplementado com sacarose 9% pH 5,5 após 9 dias de cultivo, correspondente às condições do ponto central do CCD (Bioprocessos I-L).

Na Figura 16 são mostrados os picos correspondentes aos açúcares redutores glicose (TR 10,6 min.) e frutose (TR 11,4 min.) de acordo com os tempos de retenção equivalentes aos dos padrões. A análise do sobrenadante da cultura conduzida nas condições dos bioprocessos I-L (TAB. 1) em meio suplementado com sacarose como fonte de carbono, evidenciou a hidrólise desse açúcar em glicose e frutose. Os *Aspergillus* negros são

reconhecidamente capazes de produzir atividade de invertase, de modo que a hidrólise da sacarose no meio de cultivo era esperada (NOVAKI *et al.*, 2010).

Figura 16 - Análise por HPLC e identificação de glicose e frutose em amostra de cultura de *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processo submerso suplementado com sacarose



A amostra analisada foi coletada de bioprocesso conduzido com *A. tubingensis* AN1257 inoculado em meio suplementado com sacarose 9% pH 5,5 após 9 dias de cultivo, correspondente às condições do ponto central do CCD (Bioprocessos I-L).

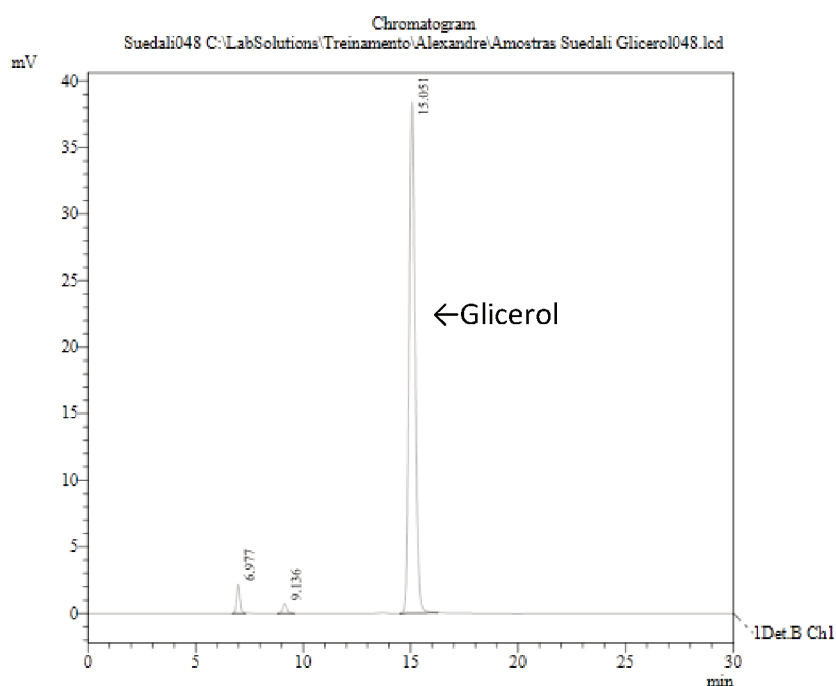
A análise por HPLC do sobrenadante da cultura ajustada nas condições centrais do CCD, correspondendo aos bioprocessos I-L (TAB. 1), em meio suplementado com glicerol, permitiu a identificação do pico correspondente a essa fonte de carbono, como também era esperado (FIG. 17).

Figura 17 - Análise por HPLC e identificação de glicerol em amostra de cultura submersa de *Aspergillus tubingensis*

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by	: Admin
Sample Name	: Suedali048
Sample ID	: Suedali-0048
Tray#	: 1
Vial #	: 12
Injection Volume	: 5 μ L
Data File Name	: Amostras Suedali Glicerol048.lcd
Method File Name	: ác orgânicos e alcoois Rezex ROA.lcm
Batch File Name	: Padroes Rezex ROA.lcb
Report File Name	: Default.lcr
Data Acquired	: 11/4/2017 04:59:08
Data Processed	: 11/4/2017 06:29:13

<Chromatogram>



A amostra analisada foi coletada de bioprocesso conduzido com *A. tubingensis* AN1257 inoculado em meio suplementado com glicerol 9% pH 5,5 após 9 dias de cultivo, correspondente às condições do ponto central do CCD.

Por meio de análise com HPLC foi verificada a ausência da produção de ácidos orgânicos consistentes com os padrões utilizados, nos bioprocessos suplementados com glicerol. Schneider *et al.* (2014) conseguiram uma produção de ácido cítrico por *A. niger* de 350 g kg, utilizando torta de Tung mais 20% de glicerol em uma fermentação em estado sólido. A alta produção de ácido cítrico relatada foi devida a complementação de uma fonte de carboidratos acrescentada de glicerol. No presente trabalho, foi possível verificar que o glicerol não sustentou o acúmulo de ácidos cítrico, succínico, málico, láctico, tartárico, acético

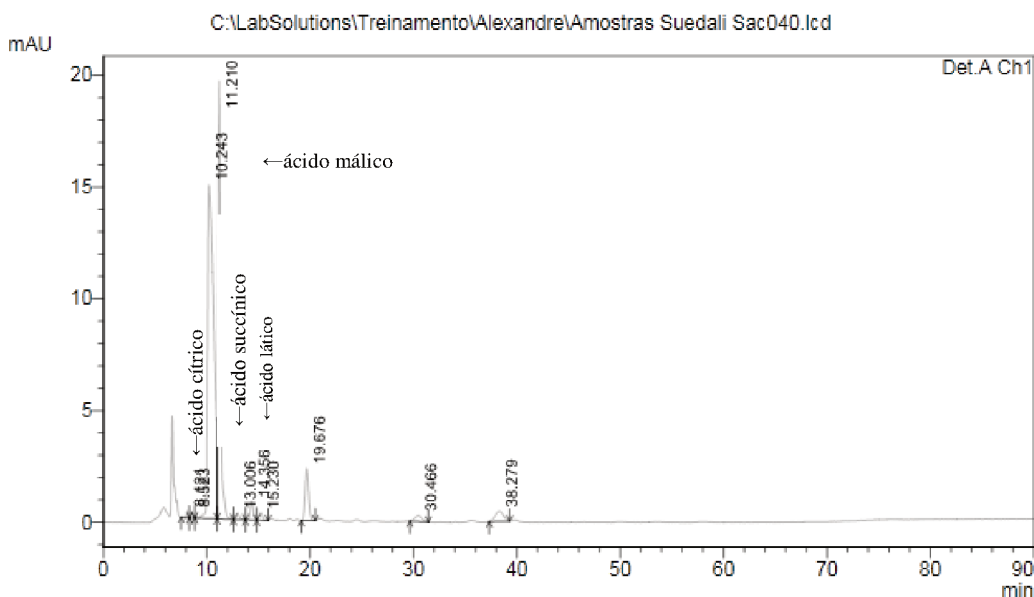
e butírico pela linhagem AN1257 nas condições aplicadas, embora não possa ser descartada a produção de outros ácidos, os quais não corresponderam aos padrões utilizados.

O sobrenadante do Bioprocesso SD, após 9 dias de cultivo, foi a melhor condição para a produção de ácidos totais, como mostrado nas Figuras 13 e 14. A análise dessa amostra por HPLC está mostrada na Figura 18. Alguns picos de ácidos orgânicos foram detectados, com seus tempos de retenção e concentração: ácido cítrico [0.2 g L⁻¹] (TR 8.5 min.), ácido málico [13.2 g L⁻¹] (TR 10.2 min.), ácido succínico [0.35 g L⁻¹] (TR 13.0 min.) e ácido láctico [0.93 g L⁻¹] (TR 14.3 min.). As concentrações finais foram calculadas multiplicando-se por 10, dado que essa foi a diluição aplicada para a preparação da amostra.

Figura 18 - Análise por HPLC e identificação de ácidos orgânicos produzidos por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processo submerso suplementado com sacarose em pH 7,0

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\...\Treinamento\Alexandre\Amostras Suedali Sac040.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Amostras Suedali Sac040
 Sample ID : Amostras Suedali Sac-0040
 Tray# : 1
 Vial # : 4
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : Amostras Suedali Sac040.lcd
 Method File Name : ác orgânicos e alcools Rezex ROA.k
 Batch File Name : GabiM.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 15/5/2017 19:18:04
 Data Processed : 15/5/2017 20:48:09



A amostra analisada foi coletada de bioprocesso conduzido com *A. tubingensis* AN1257 inoculado em meio suplementado com sacarose 12% pH 7,0 após 9 dias de cultivo, correspondente às condições do Bioprocesso SD.

A amostra de outros bioprocessos planejados por DCC foram analisados por HPLC, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Produção de ácidos orgânicos por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processos submersos delineados por desenho composto central, suplementados com sacarose

Biopro*	Tempo (dias)	Sacarose (%)	pH	Ácido cítrico (g L ⁻¹)	Ácido succínico (g L ⁻¹)	Ácido málico (g L ⁻¹)	Ácido láctico (g L ⁻¹)	Ácido tartárico (g L ⁻¹)	Ácido butírico (g L ⁻¹)	Ácido acético (g L ⁻¹)
SA	3	6,0	4,0	-	-	-	-	0,57	-	-
SA	6	6,0	4,0	0,15	0,37	0,32	0,70	0,55	-	-
SA	9	6,0	4,0	0,15	0,32	1,09	0,77	0,49	-	-
SB	3	6,0	7,0	-	-	2,40	0,67	0,56	-	-
SB	6	6,0	7,0	-	0,29	0,56	0,72	0,57	-	-
SB	9	6,0	7,0	0,28	0,32	8,30	0,97	0,53	-	-
SC	3	12,0	4,0	-	0,24	0,27		0,60	-	-
SC	6	12,0	4,0	0,14	0,32	2,30	0,71	0,51	-	-
SC	9	12,0	4,0	-	0,30	0,32	0,75	0,52	-	-
SD	3	12,0	7,0	-	-	5,40	-	0,50	-	-
SD	6	12,0	7,0	-	0,26	11,90	0,65	0,57	-	-
SD	9	12,0	7,0	0,20	0,35	13,60	0,93	-	-	-
SE	3	4,75	5,5	-	0,22	0,40	-	0,50	-	-
SE	6	4,75	5,5	-	0,21	1,50	0,70	0,54	-	-
SE	9	4,75	5,5	0,17	0,28	0,39	0,76	0,52	-	-
SF	3	13,24	5,5	-	0,28	0,27	-	0,50	-	-
SF	6	13,24	5,5	-	0,32	0,94	0,70	0,54	-	-
SF	9	13,24	5,5	-	0,28	2,70	0,71	0,53	-	-
SG	3	9,0	3,37	-	0,23	0,20	-	0,50	-	-
SG	6	9,0	3,37	-	0,27	0,28	0,66	0,54	-	-
SG	9	9,0	3,37	0,16	0,29	0,25	0,82	0,51	-	-

SH	3	9,0	7,62	-	-	6,00	-	0,54	-	-
SH	6	9,0	7,62	-	0,28	11,00	0,74	0,53	-	-
SH	9	9,0	7,62	0,21	0,49	12,00	0,96	0,52	-	-
SI	3	9,0	5,5	-	0,23	0,26	-	0,56	-	-
SI	6	9,0	5,5	-	0,34	1,39	0,65	0,56	-	-
SI	9	9,0	5,5	0,15	0,59	0,76	0,84	0,54	-	-
SJ	3	9,0	5,5	0,27	-	0,4	0,63	0,63	-	-
SJ	6	9,0	5,5	0,14	0,28	0,31	0,68	-	-	-
SJ	9	9,0	5,5	0,15	0,33	0,69	0,74	0,54	-	-
SL	3	9,0	5,5	-	0,23	0,37	0,95	-	-	-
SL	6	9,0	5,5	-	0,30	1,30	0,79	0,57	-	-
SL	9	9,0	5,5	0,19	0,40	1,14	0,71	0,51	-	-

A produção de ácidos orgânicos foi analisada por HPLC a partir de amostras coletadas de bioprocessos planejados por DCC, utilizando-se sacarose como fonte de carbono. *Bioprocessos. Em negrito estão destacados os pontos centrais do DCC. A concentração de sacarose e o pH foram aplicados como variáveis independentes. Como variáveis de respostas foram determinadas as concentrações dos ácidos orgânicos produzidos pela linhagem AN1257 nos bioprocessos SA a SL após 3, 6 e 9 dias de cultivo a 30 °C e 150 rpm.

Houve considerável produção de ácido málico após 6 dias de cultivo em alguns desses bioprocessos que foram ajustados para pH inicial igual a 7,0. No bioprocessos SB (6% de sacarose, pH 7,0) a concentração de ácido málico atingiu 8,30 g L⁻¹ após 9 dias de cultivo. O aumento da concentração de sacarose para 9% elevou a produção de ácido málico para 12 g L⁻¹ após 9 dias de cultivo, conforme determinado no sobrenadante do Bioprocessos SH (pH 7,62). Como mostrado na Tabela 3, maiores aumentos na concentração de sacarose (12%) no Bioprocessos SD (pH 7,0) se correlaciona com a máxima concentração de ácido málico obtida: 13,6 g L⁻¹ após 9 dias de cultivo, o que corrobora os dados titulométricos e sua análise derivada, os quais mostraram que essa era a melhor condição para o acúmulo de ácidos totais (FIGs. 13 e 14).

Quando a concentração de sacarose é elevada para 13,24% (Bioprocessos SF, aproximadamente 13%), a produção de ácido málico diminui (TAB. 3). A queda na produção poderia ser devida ao excesso da fonte de carbono, cuja concentração poderia estar atingindo valores limite, indicando ajuste do processo para a variável fonte de carbono. No entanto a

explicação mais provável para a redução da produção pode estar relacionada à diminuição do pH inicial do Bioprocesso SF, pH 5,5.

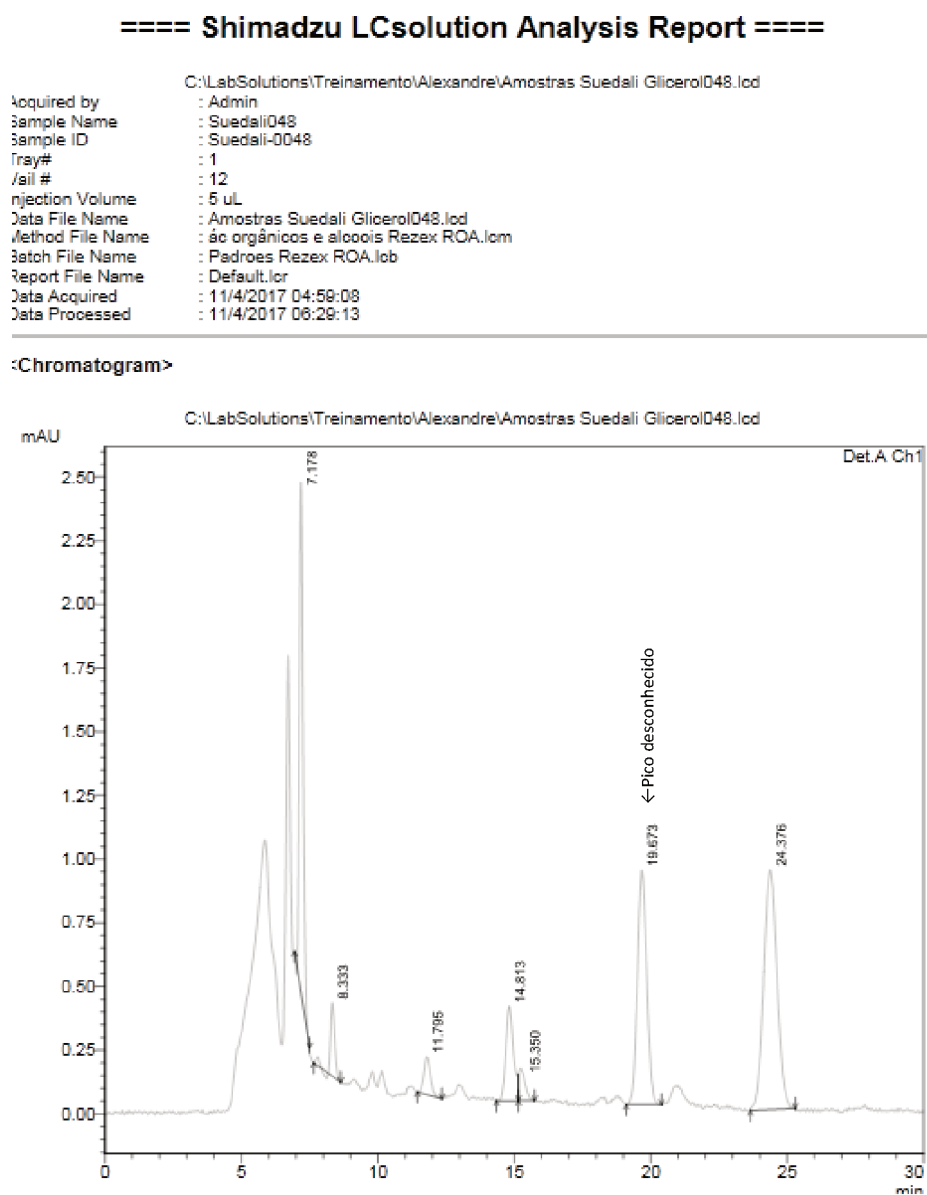
É amplamente conhecido que a produção de ácido cítrico por fungos filamentosos, especialmente por *A. niger*, é fortemente influenciada pelo pH, que deve estar próximo a 2 durante a fase ativa de produção. Outros ácidos, ao contrário, são produzidos próximo à neutralidade. Os resultados da Tabela 3 mostram que a produção de ácido málico por *A. tubingensis* AN1257 ocorre preferencialmente em pH próximo à neutralidade. É possível concluir que essa espécie produz uma gama de ácidos orgânicos, com potencial para acumular ácido málico.

O ácido málico é um ácido orgânico importante na indústria e tem a finalidade de limpeza de metais, produção de plásticos e é utilizado também na indústria de alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos (GOLDBERG *et al.*, 2006). Segundo Bercovitz *et al.* (1990) *A. niger* produziu muito mais ácido cítrico do que ácido málico nas condições estudadas. Apesar disso, encontramos nesse trabalho uma alta produção de ácido málico pela linhagem *A. tubingensis* AN1257 e pouquíssima produção de ácido cítrico.

West (2011) utilizou *A. niger* e *Aspergillus flavus* como produtores de ácido málico pela conversão de vinhaça composta por glicose, glicerol e ácido láctico. O autor obteve uma produção de 17 g L⁻¹ utilizando o fungo filamentoso *A. niger* ATCC9142 após 192 horas de cultivo. A produção de ácido málico por *A. tubingensis* AN1257 no presente trabalho alcançou 13,6 g L⁻¹ depois de 216 h (9 dias). Tal produção encoraja estudos futuros, uma vez que a linhagem ainda requer melhor compreensão de seus aspectos fisiológicos, bioquímicos e genéticos, que podem auxiliar na melhoria dos processos produtivos. O ajuste da produção biotecnológica de ácido málico pode abrir caminho para sua obtenção em escala maior de forma mais viável, visto que os meios e as condições de produção empregadas no presente trabalho foram simples e utilizaram substratos acessíveis.

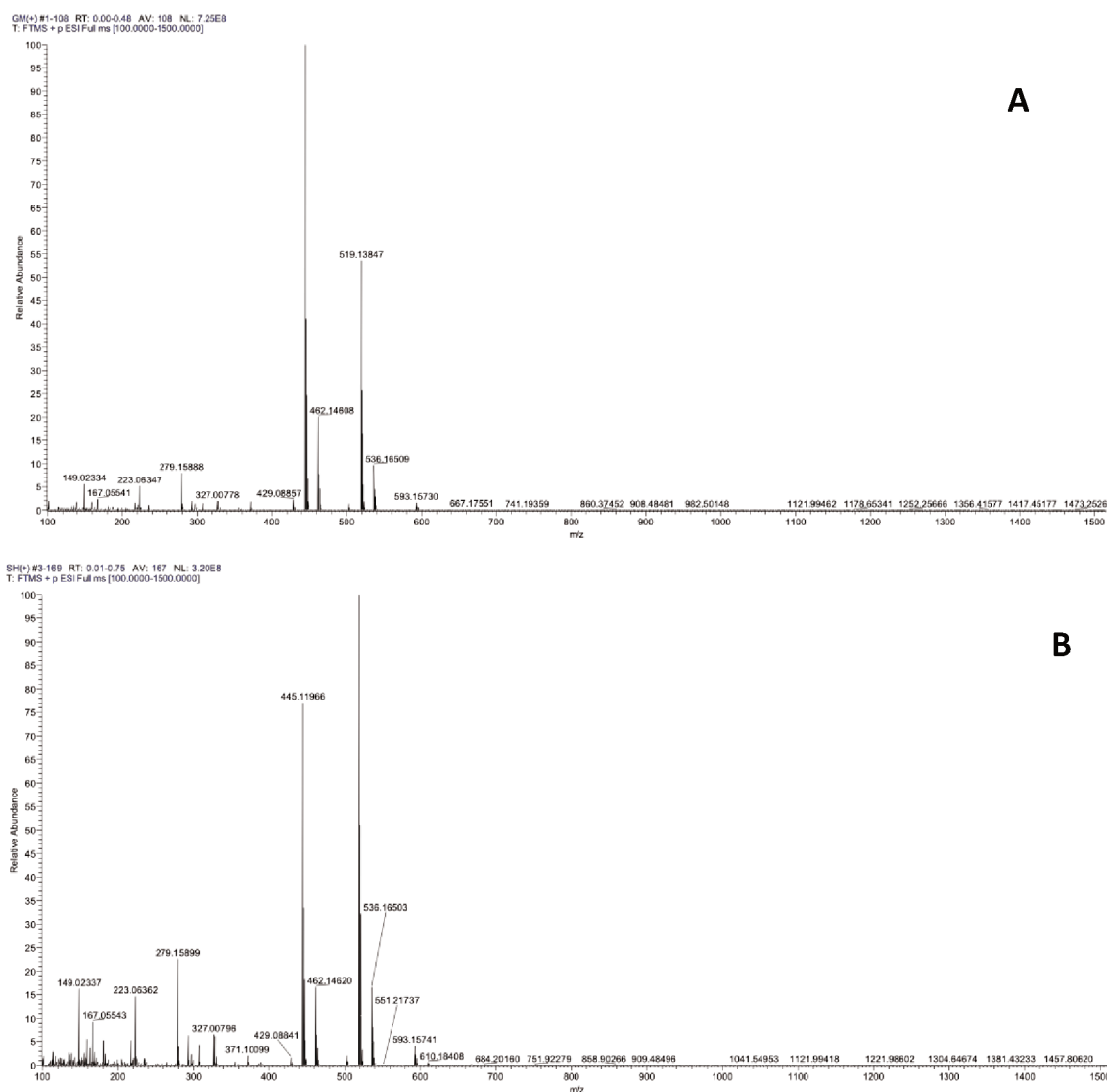
Além dos ácidos orgânicos determinados por HPLC e descritos na Tabela 3, foram conduzidos experimentos na tentativa de identificar o pico desconhecido com TR igual a 19,6 min, conforme mostrado na Figura 19. Esse mesmo pico foi detectado no sobrenadante de alguns dos bioprocessos suplementados com glicerol, bem como em todas as amostras provenientes do cultivo em sacarose.

Figura 19 – Análise por HPLC evidenciando um pico desconhecido



Amostras provenientes dos cultivos de 9 dias da linhagem *A. tubingensis* AN1257 nos bioprocessos de ponto central das culturas suplementadas com glicerol (glicerol 9% e pH 5,5) e de um dos pontos axiais das culturas suplementadas com sacarose, Bioprocesso SH (sacarose 9% e pH 7,62) foram coletadas a partir da separação por HPLC, correspondendo ao tempo de corrida de 19,6 minutos, para separação do pico contendo a substância desconhecida a ser identificada. A amostra foi analisada por ESims, conforme os resultados mostrados na Figura 20.

Figura 20 – Análise por ESims para detecção de substância desconhecida produzida por *Aspergillus tubingensis* AN1257

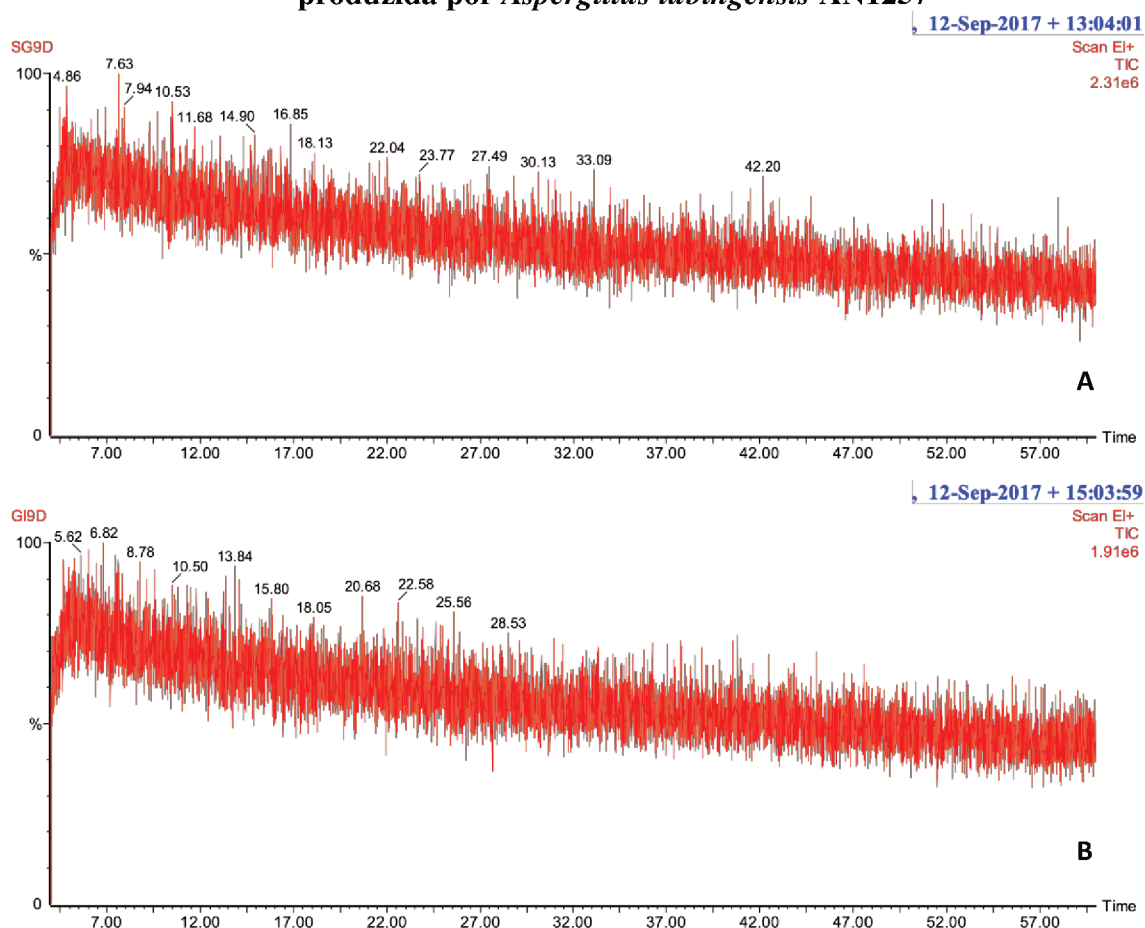


Amostras foram coletadas dos bioprocessos suplementados com (A) glicerol a 9% e pH 5,5 e (B) sacarose 9% e pH 7,2, os quais foram inoculados com *A. tubingensis* AN1257 e incubados por 9 dias. Após separação por HPLC, o pico correspondente ao tempo de retenção de 19,6 minutos foi coletado e analisado por Esims. São mostradas as análises no modo positivo.

As análises por Esims mostraram que em ambas as amostras existem vários íons, tanto no modo positivo quanto no negativo. Mas não foi possível obter as fórmulas moleculares que poderiam estar relacionadas à substância produzida por *A. tubingensis* AN1257. A análise de sobrenadantes coletados após 9 dias de cultivo de *A. tubingensis* AN1257 nos bioprocessos SG (sacarose a 9% e pH 3,37) e GL (glicerol 9% e pH 5,5) foi conduzida por CG-MS, na tentativa de elucidar a substância correspondente ao pico desconhecido, com resultados mostrados nas Figuras 21A e 21B, respectivamente. Como se pode observar, a análise não

evidenciou a presença de pico algum, de modo que a molécula desconhecida produzida pela linhagem AN1257 não pode ser identificada.

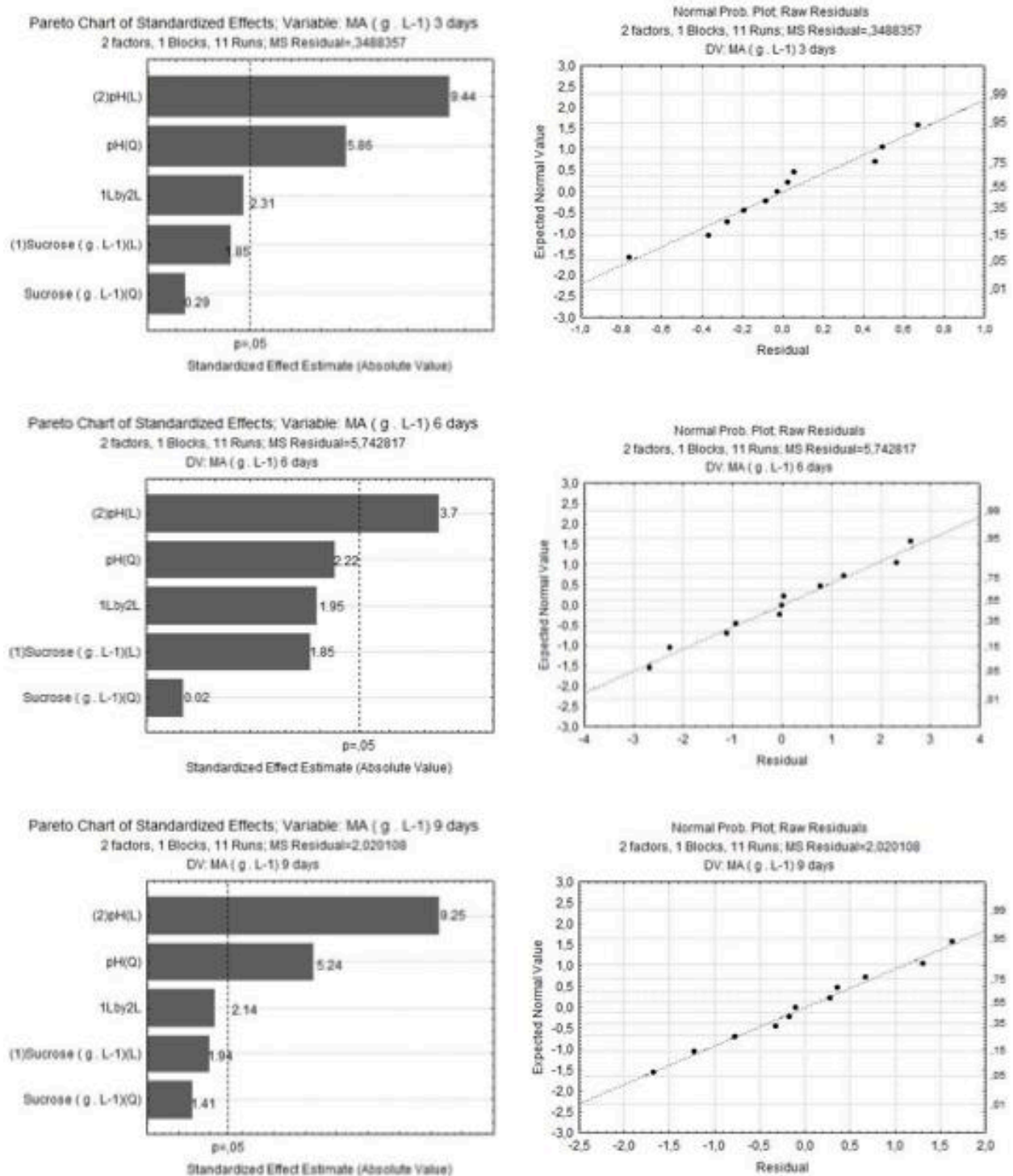
Figura 21 – Análise por CG-MS para detecção de substância desconhecida produzida por *Aspergillus tubingensis* AN1257



Amostras foram coletadas dos bioprocessos suplementados com sacarose a 9% e pH 3,37, bioprocesso SG (A); e glicerol 9% e pH 5,5, bioprocesso GL (B) inoculados com *A. tubingensis* AN1257 e incubados por 9 dias.

Os resultados dos bioprocessos planejados por DCC foram analisados com o software *Statistics* para determinar a significância dos efeitos do pH e da concentração de sacarose sobre a produção de ácido málico pela linhagem AN1257. As condições utilizadas para a produção desse ácido não revelaram efeito significativo da concentração de sacarose sobre o acúmulo do produto (FIG. 22). Os gráficos de Pareto mostram que o efeito da sacarose sobre a produção de ácido málico não foi significativo para nenhum dos tempos de cultivo analisados (3, 6 e 9 dias). Assim, embora o aumento da concentração de sacarose seja coincidente com o aumento na produção de ácido málico, como verificado nas análises titulométricas e na determinação da concentração do produto por HPLC, a diferença não foi significativa do ponto de vista estatístico.

Figura 22 – Efeito estatístico das variáveis pH e concentração de sacarose sobre a produção de ácido málico por *Aspergillus tubingensis* AN1257



Os gráficos de Pareto mostram a intensidade dos efeitos lineares e quadráticos do pH e da concentração de sacarose sobre a produção de ácido málico após 3, 6 e 9 dias na coluna da esquerda. A coluna da direita mostra os gráficos de probabilidade normal correspondentes a cada análise estatística.

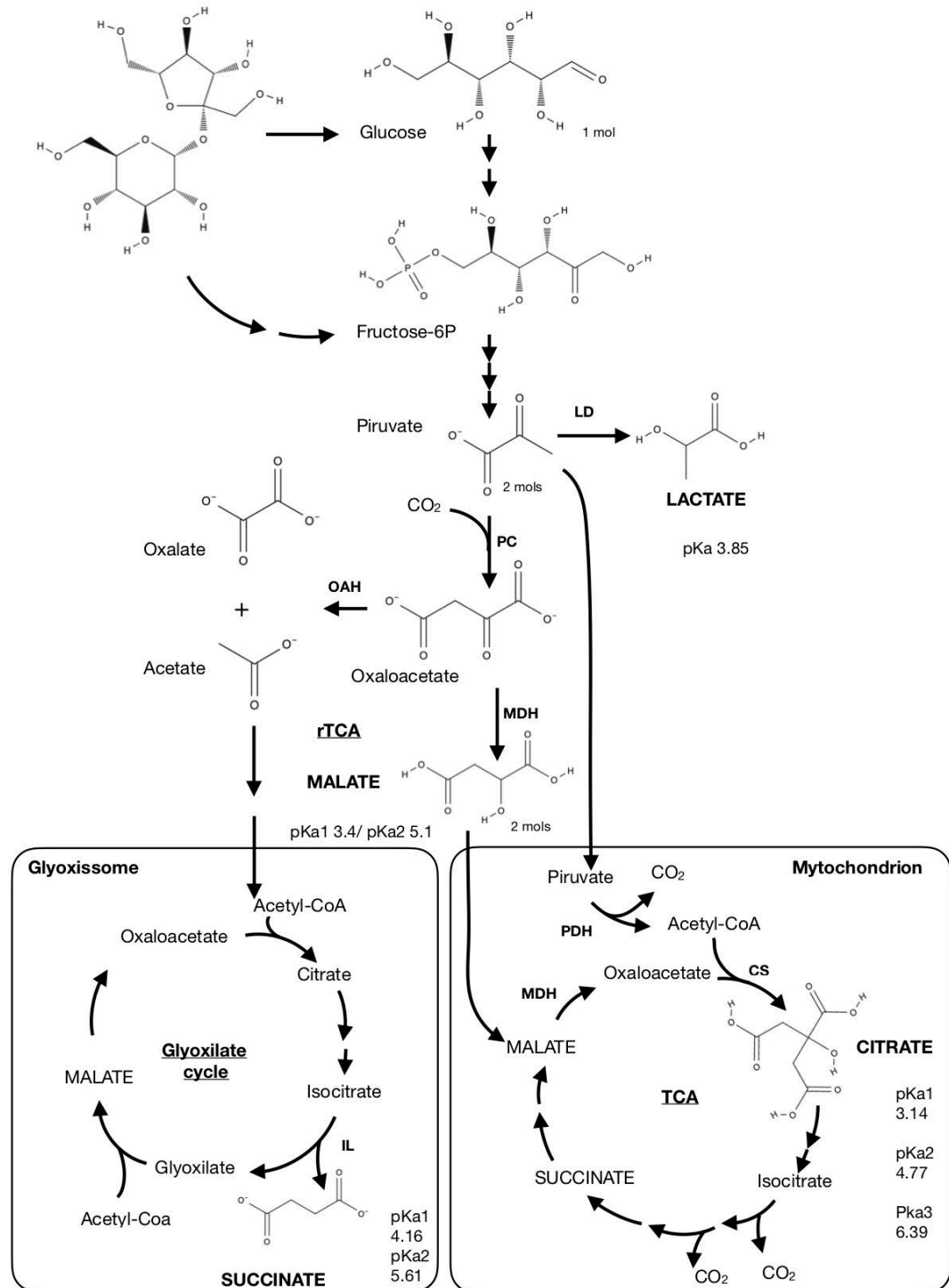
A produção de ácido málico foi fortemente influenciada pelo pH da cultura, para o qual foram determinados efeitos quadráticos e lineares positivos e significativos. Os efeitos lineares do pH foram de 9,44; 3,37 e 9,25 para a produção de ácido málico após 3, 6 e 9 dias de cultivo, respectivamente (FIG. 22). Tais efeitos positivos confirmam estatisticamente que o pH mais elevado é melhor para o acúmulo de ácido málico por *A. tubingensis* AN1257. Como mostrado na Figura 22, o efeito quadrático do pH sobre o acúmulo de ácido málico após 9 dias de cultivo também foi positivo, confirmando as tendências anteriormente verificadas por análise titulométrica e HPLC, quais sejam: a produção de ácidos totais e de ácido málico pela linhagem AN1257 é significativamente influenciada pelo pH, que deve estar mais próximo à neutralidade.

As possíveis vias bioquímicas para a obtenção de ácidos cítrico, succínico, málico e láctico por fungos filamentosos estão resumidas na Figura 23. O ácido tartárico não foi incluído, pois sua via de síntese em fungos não está completamente esclarecida. Ao contrário, a via de acúmulo de ácido cítrico por *A. niger* está bem elucidada. Esse ácido é obtido a partir da conversão do piruvato produzido no catabolismo de carboidratos, especialmente sob condições de excesso de glicose ou outro sacarídeo de rápida assimilação. Para o acúmulo de ácido cítrico, uma combinação de fatores é necessária, incluindo altas taxas de catabolismo de carbono pela via glicolítica, baixo pH e limitação de manganês e outros metais.

Após oxidação na via glicolítica, 1 mol de glicose é convertido a 2 moles de piruvato, que são convertidos a 1 mol de oxaloacetato - sob catálise da enzima citossólica piruvato carboxylase - e 1 mol de acetil-CoA - sob catálise do complexo mitocondrial da piruvato desidrogenase. Antes da condensação de oxaloacetato e acetil-CoA no ciclo TCA para formar citrato, o precursor oxaloacetato é reduzido a malato no citossol, sendo posteriormente reoxidado no interior da mitocôndria (FIG. 23). Para sustentar o acúmulo de ácido cítrico, a enzima oxaloacetato acetil hidrólise (OAH) - que converte oxaloacetato a oxalato, um frequente produto secundário da produção de ácido cítrico - precisa ser inibida. A inibição pode ser alcançada pela diminuição do pH do meio e pela limitação de metais, dado que a OAH é ativa em pH 5-6 e requer Mn^{2+} (PLASSARD; FRANSSON, 2009).

O acúmulo de ácido succínico é menos compreendido. Porém, uma vez que é, como o citrato, um intermediário do TCA, a conversão de glicose a piruvato, e deste a oxaloacetato, pode ser importante (FIG. 23).

Figura 23 – Potenciais vias metabólicas para a obtenção de ácidos orgânicos



Fonte: Coelho *et al.* (artigo submetido). Os ácidos produzidos por *A. tubingensis* AN1257 são mostrados em letras capitais. Suas estruturas e pKas são apresentadas na figura. Estruturas moleculares foram obtidas de Molview (molview.org). Algumas das enzimas e vias metabólicas chaves para a obtenção dos ácidos orgânicos são indicadas. A rota metabólica inicia-se pela conversão de sacarose a substratos glicolíticos. A conversão de 1 mol de glicose produz 2 moles de malato; 1 mol de sacarose produz 4 moles de malato. TCA, ciclo dos ácidos tricarboxílicos; rTCA, TCA redutivo; LD, lactato desidrogenase; PC, piruvato carboxilase; MDH, malato desidrogenase; OAH, oxaloacetato acetil-hidrolase; PDH, complexo da piruvato desidrogenase; CS, citrato sintase; IL, isocitrato liase.

A formação de oxaloacetato ocorre no citossol pela carboxilação do piruvato e, após redução a malato, ocorre o transporte para o interior da mitocôndria e oxidação no TCA. Dado que as reações são reversíveis, o malato poderia ser reduzido a fumarato e succinato, ou simplesmente seguir o caminho natural do ciclo, sendo convertido a citrato e daí por diante a succinato. A formação no ciclo do glioxilato também poderia ocorrer, o que requer investigação. A entrada do malato no glioxissomo com posterior conversão a citrato e em seguida a succinato é plausível, visto que esse é um caminho alternativo para a oxidação de acetil-CoA.

O ácido málico é outro intermediário comum ao TCA e ao ciclo do glioxilato, que, entretanto, pode ser formado a partir do oxaloacetato no citossol, como produto do ciclo redutivo do TCA, como mostrado na Figura 23. Brown *et al.* (2013) produziram uma linhagem de *Aspergillus oryzae* com diversas cópias dos genes nativos que codificam as enzimas piruvato carboxilase e malato desidrogenase, alcançando grandes aumentos na produção de ácido málico. Isso confirma o TCA redutivo como a via de obtenção de malato em *Aspergillus*, embora a investigação do mecanismo em *A. tubingensis* não tenha sido realizada. Para o acúmulo de malato, o pH próximo à neutralidade é necessário, ao contrário da condição ácida essencial para a produção de ácido cítrico. A questão é por que o pH 6 ou 7 é melhor, uma vez que a ativação da OAH poderia consumir o precursor oxaloacetato para formar oxalato. De fato, a manipulação de *A. niger* para conter várias cópias do gene codificador da OAH aumentou a produção de ácido oxálico, enquanto a deleção desse gene e a inserção de cópias gênicas codificadoras de piruvato carboxilase e malato desidrogenase resultaram em uma linhagem de elevado acúmulo de ácido málico (XU *et al.*, 2019). Assim, o desafio é inativar seletivamente a OAH, mas não a enzima malato desidrogenase.

Uma vez que as vias de acúmulo de ácido tartárico são mais bem compreendidas em vegetais do que em fungos, foi empreendida uma análise por Bioinformática a fim de verificar a presença de genes homólogos que pudessem indicar a existência de determinadas rotas bioquímicas para obtenção desse ácido.

O mapa 00630 da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (KEGG), construído com base em uma variedade de investigações e trabalhos publicados mostra que a via para a síntese de ácido tartárico está no metabolismo de glioxilato e outros ácidos dicarboxílicos (KEGG, https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00630). O tartarato pode ser formado a partir do oxaloacetato originado do metabolismo de piruvato, em reação reversível catalisada pela tartarato desidrogenase. Também poderia ser formado a partir do oxaloglicolato, ainda sob catálise da mesma enzima, ou a partir do meso-tartarato, ambos

ligados ao metabolismo do ácido ascórbico. A via do ascorbato é importante para a produção de tartarato em plantas superiores, inclusive em uvas, nas quais o ácido tartárico contribui para o componente ácido e confere estabilidade microbiológica. Esse ácido é formado em *Vitis vinifera* a partir do catabolismo do ácido ascórbico a L-idonato, que é em seguida convertido a D-gluconato e finalmente a tartarato (CHOLET *et al.*, 2016). Relatos das rotas que operam em fungos são escassos, assim, foram pesquisados em bancos de dados de sequências biológicas a presença de genes fúngicos que codificam as enzimas para a produção de ácido tartárico, para se obter uma inferência sobre as vias bioquímicas utilizadas nesses organismos: tartarato desidratase, que desempenha papel na formação a partir de oxaloacetato; tartarato epimerase, que possui um papel na interconversão dos isômeros de ácido tartárico.

Seguindo genes ortólogos disponibilizados pela KEGG para a subunidade alfa da enzima tartarato desidrogenase (EC 4.3.1.32, KEGG K03779) foram encontradas várias enzimas bacterianas com o mesmo EC, as quais foram acessadas na página do banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A087FW24>). Utilizando um programa de busca (*Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST) ajustado para a busca de proteínas (BLASTp) foi realizada uma pesquisa no banco de dados do Centro Nacional de Informação de Biotecnologia dos Estados Unidos (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), por meio da qual foram recuperadas duas sequências de proteínas fúngicas, ambas de *Beauveria bassiana*. Para a pesquisa foi utilizada a sequência codificada KGQ11123.1, referente à atividade de tartarato desidrogenase. A busca de outras sequências com o programa BLASTp permitiu encontrar 113 proteínas fúngicas com graus baixos de homologia, sendo 61 pertencentes ao filo Ascomycota e 8 ao gênero *Aspergillus*. As sequências de *Aspergillus* apresentavam função relacionada ao sistema sensor de dois componentes histidina quinase, nenhuma correlacionada à síntese de ácido tartárico.

Uma busca pela tartarato epimerase no banco de dados GenBank (NCBI) recuperou 18 proteínas, 4 das quais eram correspondentes a tartarato epimerases bacterianas. O programa BLASTp foi aplicado com a sequência de tartarato hidratase de *Bradyrhizobium japonicum* (PDB 2DW6_D) contra as sequências fúngicas depositadas, obtendo-se 189 resultados. Entre os 100 alinhamentos mais significantes, nenhuma das proteínas recuperadas apresentava atividade de tartarato epimerase especificamente descrita, sendo que a maioria das demais correspondia a outras enolases, racemases e hidratases, com identidade sempre inferior a 30%. Tais análises mostram que, embora a linhagem AN1257 tenha acumulado

ácido tartárico em pequenas quantidades, a rota fúngica para elucidar sua formação requer outros estudos.

5.2 Conversão de glicerol a L-asparaginase

A determinação da atividade de L-asparaginase no sobrenadante das culturas mostrou que após 48 horas quase nenhuma atividade é produzida por *Fusarium* sp. T22.2. Por essa razão, os resultados da produção de L-asparaginase nos bioprocessos planejados nas condições descritas na Tabela 4, são mostrados apenas a partir de 72 horas, quando a atividade enzimática começa a aumentar.

Tabela 4 - Produção de L-asparaginase por *Fusarium* sp. T22.2 em bioprocessos delineados por planejamento fatorial

Bioprocesso	Glicerol (g L ⁻¹)	Asparagina (g L ⁻¹)	pH	L-asparaginase (UI)		
				72 h	96 h	120 h
1	0.50	0.50	5.50	1.32±0.82	1.49±0.13	1.49±0.22
2	20.00	0.50	5.50	0.75±0.07	1.56±0.08	0.55±0.15
3	0.50	10.00	5.50	2.99±0.08	2.69±0.33	8.18±1.01
4	20.00	10.00	5.50	3.19±0.27	4.65±0.88	14.59±1.06
5	0.50	0.50	6.50	0.81±0.02	0.73±0.06	0.37±0.23
6	20.00	0.50	6.50	1.89±0.61	0.94±0.11	1.08±0.11
7	0.50	10.00	6.50	1.25±0.40	1.79±0.62	3.17±0.05
8	20.00	10.00	6.50	10.34±1.22	27.33±1.71	3.87±1.08

Os processos foram delineados pela combinação dos valores mínimos e máximos de glicerol, L-asparagina e pH. A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante das culturas, sendo mostrada como a média ± desvio padrão de três replicatas.

A máxima atividade foi obtida após 96 horas, no bioprocesso 8, e atingiu 27,33 UI. Esse processo – suplementado com glicerol a 20 g L⁻¹; L-asparagina a 10 g L⁻¹ e ajustado para pH 6,5 – foi a melhor condição para a produção enzimática, permitindo obter alta atividade enzimática mesmo após 72 horas de cultivo (10,34 UI). Outros bioprocessos também resultaram em boas atividades enzimáticas, embora após períodos mais longos de incubação.

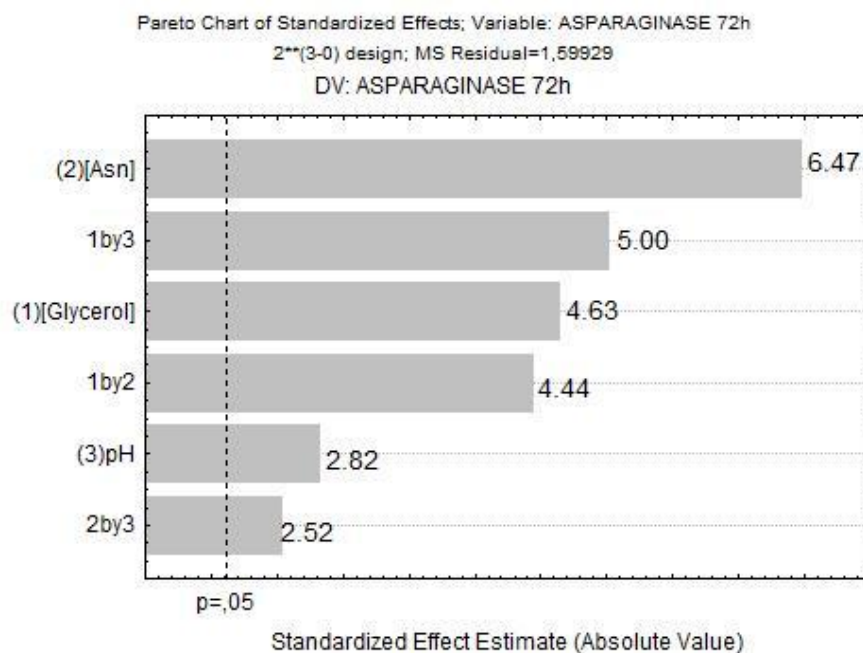
Os bioprocessos 3 e 4 induziram a produção de 8,18 UI e 14,59 UI de L-asparaginase após 120 horas (TAB. 4).

A análise estatística dos dados mostrados na Tabela 4 permitiram a determinação dos efeitos das variáveis independentes (glicerol, L-asparagina e pH) e suas interações. Os efeitos são mostrados por meio de gráficos de Pareto para a resposta atividade de L-asparaginase após 72 horas, 96 horas e 120 horas. Todos os efeitos determinados nas respostas de 72 e 96 horas foram estatisticamente significantes a um valor de $p = 0,05$.

A produção de L-asparaginase após 72 horas de cultivo foi forte e positivamente influenciada pela concentração de L-asparagina, que mostrou o efeito mais alto dentre as variáveis analisadas (6,47), seguida pela concentração de glicerol (4,63) e pelo pH (2,82).

Tais efeitos positivos indicam que o nível mais alto de cada variável deveria ser aplicado para melhorar a produção, ou seja, L-asparagina a 10 g L⁻¹ deve ser utilizada ao invés da concentração de 0,5 g L⁻¹. Da mesma forma, a suplementação de glicerol a 20 g L⁻¹ é preferível para se obter melhor produção enzimática do que a concentração de 0,5 g L⁻¹. Os dados mostraram que o pH próximo à neutralidade é melhor do que um valor ácido para a produção da enzima após 72 horas. Entretanto, dentre essas variáveis, a mais importante foi a concentração de L-asparagina. Mesmo assim, algumas das interações entre as variáveis foram mais importantes do que o efeito de cada variável individual. Por exemplo, a interação 1by3 (glicerol x pH) apresentou um efeito igual a 5 sobre a produção enzimática, mais elevado do que os efeitos isolados do glicerol e do pH. O efeito positivo da interação 1by3 significa que, em concentrações maiores de glicerol, um valor maior do pH deve ser aplicado para melhorar a produção de L-asparaginase após 72 horas (FIG. 24).

Figura 24 - Efeitos da concentração de glicerol, L-asparagina e do pH sobre a produção de L-asparaginase por *Fusarium sp.* T22.2 após 72 horas de cultivo

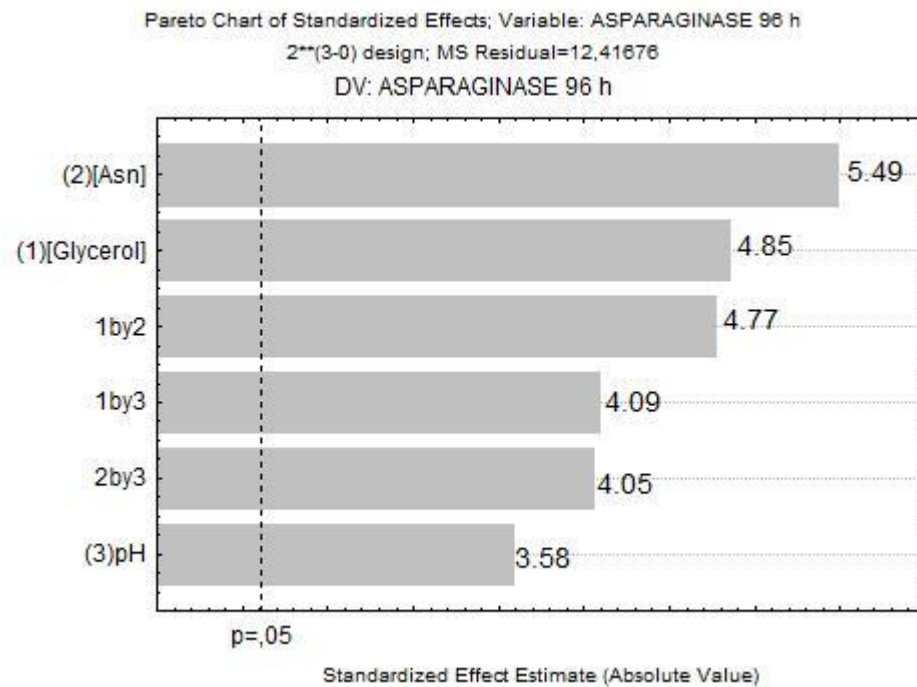


Fonte: *Programa Statistica 7.0*. Gráfico de Pareto mostrando as interações: 1by3, glicerol e pH; 1by2, glicerol e L-asparagina; 2by3, L-asparagina e pH.

As interações 1by2 (glicerol x L-asparagina) e 2by3 (L-asparagina x pH) também apresentaram efeitos positivos para a produção enzimática. Dessa forma, o ajuste da produção foi facilitado, porque tais efeitos demandam que aumentos em uma variável sejam seguidos por aumentos nas demais, em obediência aos efeitos individuais, os quais também indicaram o nível mais alto de cada variável como mais adequado para a produção da enzima.

Foi determinado um efeito altamente significativo e positivo da concentração de L-asparagina sobre a produção de L-asparaginase por *Fusarium sp.* T22.2 após 96 horas de cultivo (FIG. 25). Esse efeito (5,49) foi semelhante ao efeito determinado para a mesma variável sobre a produção enzimática obtida após 72 horas de cultivo (6,47).

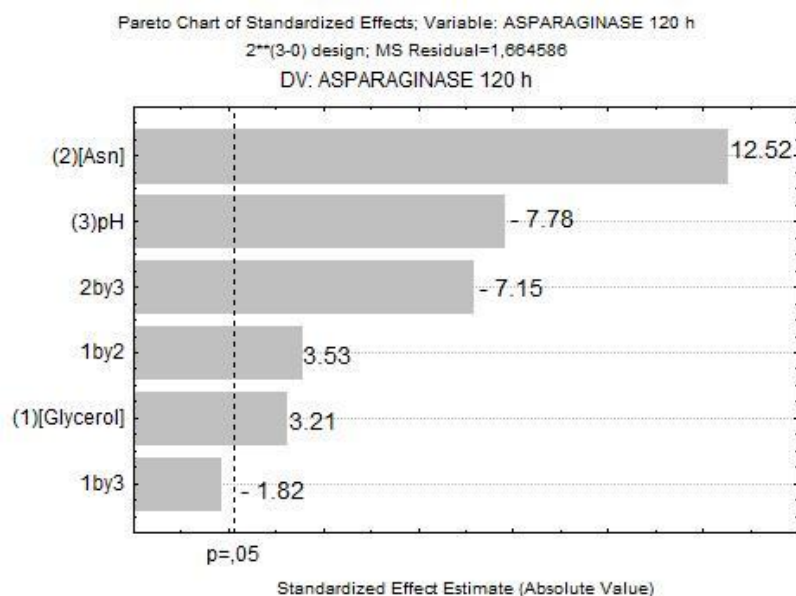
Figura 25 - Efeitos da concentração de glicerol, L-asparagina e do pH sobre a produção de L-asparaginase por *Fusarium* sp. T22.2 após 96 horas de cultivo



Fonte: *Programa Statistica 7.0*. Gráfico de Pareto mostrando as interações: 1by3, glicerol e pH; 1by2, glicerol e L-asparagina; 2by3, L-asparagina e pH.

Entretanto, após 120 horas de cultivo, a concentração de L-asparagina apresentou seu maior efeito (12,52) sobre a produção enzimática, conforme mostrado na (FIG. 26). O forte efeito positivo da concentração de L-asparagina na produção da enzima em culturas de 120 horas pode indicar que, para longos tempos de incubação, a concentração dessa fonte de nitrogênio, que possivelmente atua como indutor do gene codificador de L-asparaginase, precisa ser ajustada em valores maiores no meio inicial, uma vez que é progressivamente esgotada ao decorrer do processo produtivo.

Figura 26 - Efeitos da concentração de glicerol, L-asparagina e do pH sobre a produção de L-asparaginase por *Fusarium* sp. T22.2 após 120 horas de cultivo



Fonte: *Programa Statistica 7.0*. Gráfico de Pareto mostrando as interações: 1by3, glicerol e pH; 1by2, glicerol e L-asparagina; 2by3, L-asparagina e pH.

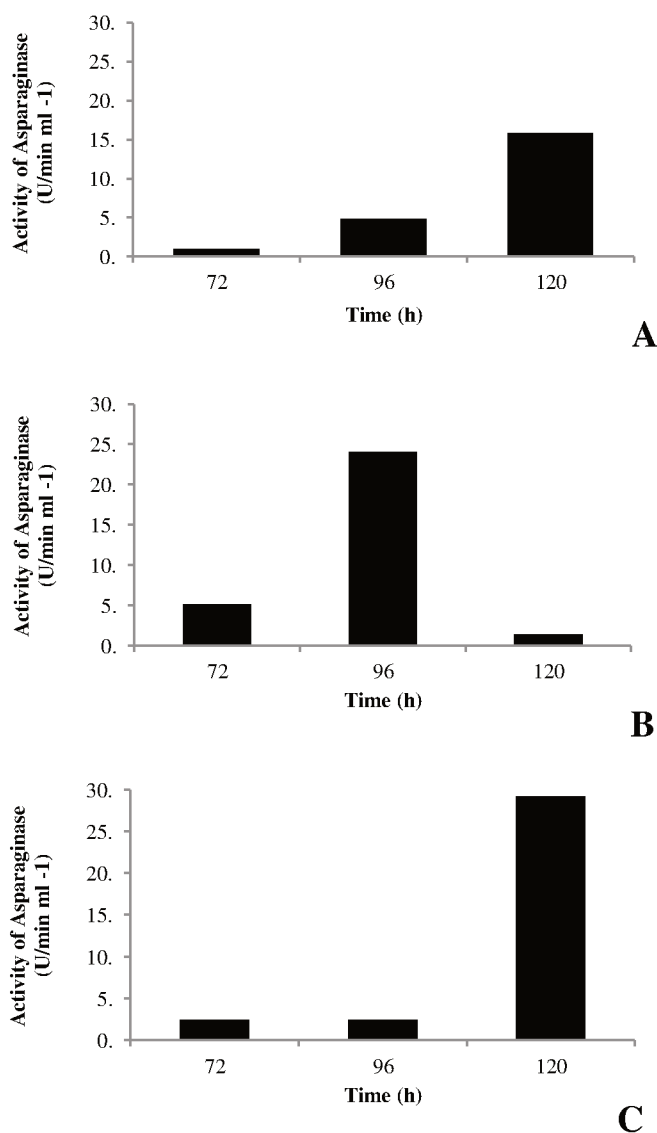
Os efeitos do glicerol sobre a produção da enzima foram semelhantes após 72 horas (4,63) e 96 horas (4,85) de cultivo (FIGs. 24 e 25). Entretanto, o efeito do glicerol diminuiu após 120 horas de cultivo para 3,21 como mostrado na Figura 26. Assim, infere-se que as funções do glicerol e da L-asparagina como variáveis do processo produtivo são diferentes. Como fonte de carbono, a função do glicerol pode ter sido sustentar o crescimento da linhagem, um papel mais importante nos tempos iniciais de cultivo do que ao final do processo, quando a biomassa produtora já está formada.

A alteração mais marcante no comportamento dos efeitos para a produção da enzima foi a determinada para o pH, cujo efeito tornou-se negativo após 120 horas de cultivo, bem como de sua interação com a concentração de L-asparagina, interação 2by3, conforme mostrado na Figura 26. Tais dados indicam que, para longos períodos de cultivo, o ajuste do pH inicial do meio no menor nível avaliado (pH 5,5) é melhor para a produção enzimática. Analisando em função do tempo de cultivo, é possível interpretar que o ajuste do pH no maior valor aplicado, ou seja pH igual a 6,5, próximo à neutralidade, tende a induzir uma produção mais rápida do que o pH mais ácido 5,5, antecipando a máxima da produção de L-asparaginase.

5.2.1 Melhoramento da produção de L-asparaginase

Ao se considerar os efeitos determinados para as variáveis e suas interações, assim como máxima atividade enzimática produzida após 96 horas, concluiu-se que valores semelhantes aos maiores níveis de cada variável são benéficos para o processo de produção. Para testar essa hipótese, três condições foram aplicadas, cujos resultados estão mostrados na (FIG. 27).

Figura 27 – Produção de L-asparaginase por *Fusarium* sp. T22.2 em bioprocessos melhorados



Culturas de *Fusarium* sp. T.22.2 foram preparadas em três meios, formulados como segue: Bioprocesso A (glicerol 25 g L⁻¹; L-asparagina 5 g L⁻¹; pH 8.0); Bioprocesso B (glicerol 29,7 g L⁻¹; L-asparagina 10 g L⁻¹; pH 7.0); Bioprocesso C (glicerol 5 g L⁻¹; L-asparagina 15 g L⁻¹; pH 6.0).

Na primeira condição desenvolvida para a produção de L-asparaginase, bioprocesso A, os valores para a concentração de glicerol e para o pH foram ajustados acima do maior valor aplicado nos bioprocessos planejados, enquanto a concentração de L-asparagina foi ajustada em um valor intermediário. Essa condição induziu produção de 15,66 UI de L-asparaginase, mas o tempo para obter a máxima da atividade enzimática na cultura foi transferido para 120 horas (FIG. 27A).

A produção da enzima em menores concentrações de L-asparagina é preferível porque esse é um substrato de alto custo. Embora a produção máxima tenha atrasado para 120 horas, a atividade produzida no bioprocesso A ainda foi alta: 15,66 UI. Hosamani *et al.* (2011) avaliaram diferentes fontes de carbono para a produção de L-asparaginase por *Fusarium equiseti* por fermentação em estado sólido: foram produzidas 3,26 U/ml e 0,21 U/mL nas fermentações conduzidas com farinha de soja e bagaço de cana, respectivamente. Deshpandes *et al.* (2014) utilizaram *Streptomyces ginsengisoli* para produzir L-asparaginase por fermentação submersa em meio suplementado com sacarose, glicose, lactose e manitol. Após a otimização das condições esses autores conseguiram uma produção de 3,23 mol/mL da enzima.

O cultivo de *Fusarium* sp. T22.2 nas condições do bioprocesso B (FIG. 27B) elevou a produção de L-asparaginase em comparação com aquela obtida no bioprocesso A. Pelo ajuste do meio com glicerol a $29,7 \text{ g L}^{-1}$; L-asparagina a 10 g L^{-1} e pH 7, foi possível obter 23,92 UI de L-asparaginase após 96 horas. Um tempo menor de produção é preferível aos longos bioprocessos. A atividade enzimática produzida no bioprocesso B foi levemente inferior àquela produzida no Bioprocessos 8 (TAB. 4), talvez pela altíssima concentração de glicerol que foi utilizada ($29,7 \text{ g L}^{-1}$).

A melhor condição para a produção da enzima pela linhagem T22.2 foi o bioprocessos C, no qual a atividade atingiu 29,08 UI após 120 horas. Nessa condição, o pH foi ajustado para 6,0, levemente abaixo do pH 6,5 indicado como preferencial para a produção de L-asparaginase segundo o planejamento fatorial. A concentração de L-asparagina foi ajustada para 15 g L^{-1} , um valor mais alto do que o indicado no planejamento fatorial (10 g L^{-1}) e o glicerol foi ajustado para 5 g L^{-1} , 10 vezes mais do que o valor mínimo aplicado no planejamento fatorial ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), porém 3 vezes menos do que o nível máximo (20 g L^{-1}).

Todos os três bioprocessos A, B e C delineados com base nas análises estatísticas e nos efeitos determinados para a concentração de glicerol, de L-asparagina e o pH, bem como nos efeitos das interações entre as variáveis (FIGs. 24-26) mostraram-se como boas condições para a produção de L-asparaginase por *Fusarium* sp. T22.2. Por meio dessa abordagem, foi

possível elevar a produção em um fator de aproximadamente 40 vezes comparado com os estudos iniciais da linhagem T22.2 (GONÇALVES *et al.*, 2016). Einsfeldt *et al.* (2016) produziram L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* expressa em *E. coli*, conseguindo uma atividade extracelular de 0,13 U/ml.

Bactérias isoladas do solo foram testadas quanto à produção de L-asparaginase, em um trabalho no qual a linhagem *Streptococcus* spp. D1 produziu 11,6 U/ml (WAKIL; ADELEGAN, 2015). Vachhani e Desai (2018) também isolaram várias bactérias do solo para a produção de L-asparaginase e seu melhor isolado produziu 18,66 U/ml após 96 horas de cultivo em meio triptona glicose extrato de levedura suplementado com 1% de L-asparagina. Em outro trabalho, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JHS-71 produziu atividade de L-asparaginase igual a 240 U/ml (BADOEI-DALFARD, 2016). Esses estudos relatam diversos isolados bacterianos produtores de L-asparaginase, porém, uma vez que as enzimas bacterianas utilizadas nas formulações comerciais são usualmente relacionadas a respostas alérgicas severas, seria adequado investigar se as enzimas eucariontes como as obtidas de fungos, poderiam apresentar menos efeitos adversos. Como suporte para os estudos sobre L-asparaginases de origem fúngica, em relação às suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, presença ou ausência de atividade secundária de L-glutaminase – como inerente a diversas formas bacterianas da enzima – bem como para estudos posteriores de cinética, é importante aumentar a produção de modo a atingir atividades adequadas, como realizado no presente trabalho.

5.2.2 Verificação da produção de atividade de L-glutaminase

A atividade de L-glutaminase foi testada utilizando as mesmas concentrações de reagentes do bioprocessamento C que produziu maior quantidade de L-asparaginase 29,08UI em 120h, porém o substrato L-asparagina foi substituído por L-glutamina. Foi verificado que não houve atividade glutaminásica em 72 e 96h, apenas uma pequena atividade de 0,65UI após 120h (TAB. 5). Assim, o fungo *Fusarium* sp. T22.2 tem um grande potencial como produtor de L-asparaginase sem produzir expressiva atividade de L-glutaminase um causador dos efeitos colaterais no tratamento de LLA.

Tabela 5 - Avaliação da produção de L-glutaminase por *Fusarium* sp. T22.2

Bioprocesso	Glicerol	Asparagina	Glutamina	pH	72h	96h	120h
	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)				
L-asparaginase (UI)	5.0	15.0	0.0	6.0	2.31	2.32	29.08
L-glutaminase (UI)	5.0	0.0	15.0	6.0	0.0	0.0	0.65

6 CONCLUSÃO

Ácidos orgânicos e enzimas podem ser produzidos por micro-organismos. O grande desafio é o estabelecimento de métodos através do conhecimento da fisiologia e bioquímica desses seres para que seja obtido o acúmulo dos produtos desejados. No presente trabalho, foram analisadas três linhagens de fungos filamentosos, das quais duas são endêmicas da região de Diamantina, *A. tubingensis* AN1257 e *Fusarium* sp. T22.2. *Aspergillus niger* 10v10, um conhecido produtor industrial de ácido cítrico, foi utilizado para servir como controle dos experimentos nos quais se investigou o potencial de produção de ácidos orgânicos. Sacarose e glicerol foram usados como fontes de carbono, sendo que o último é um coproduto da cadeia do Biodiesel, contribuindo assim para evitar o seu descarte na natureza.

A partir de uma triagem de ácidos orgânicos foi verificado que a linhagem AN1257 cultivada em pH 4 em meio com sacarose produziu mais ácido do que a linhagem 10v10. O índice de acidogênese da linhagem AN1257 também foi alto em meio de triagem suplementado com glicerol. Desse modo, foi possível concluir que *A. tubingensis* AN1257 apresenta elevado potencial para o desenvolvimento de processos de produção de ácidos orgânicos e para a bioconversão do glicerol.

A condução de processos submersos com *A. tubingensis* AN1257 demonstrou que nas condições estudadas, o glicerol não foi eficaz como fonte de carbono para a produção de ácidos orgânicos cítrico, málico, succínico, tartárico, láctico, butírico ou acético. Porém, a acidificação do meio ao longo do processo foi evidente, sugerindo que outras substâncias ácidas devem ter sido produzidas. Análises por HPLC, CG-MS e Eletrospray permitiram detectar a presença de uma substância não identificada, produzida em todos os bioprocessos suplementados com sacarose e também em alguns bioprocessos suplementados com glicerol. Contudo essa substância não foi ainda identificada.

A análise das culturas de *A. tubingensis* AN1257 em bioprocessos suplementados com sacarose mostrou seu potencial promissor para o desenvolvimento de processo de obtenção de ácido málico, um produto de valor industrial atualmente obtido como derivado do petróleo. A produção de ácido málico alcançou, ainda sem ajuste, 13,6 g L⁻¹ após 9 dias de cultivo.

O uso de glicerol como fonte de carbono também apresenta grande interesse para a produção de L-asparaginase, uma enzima terapêutica de elevado valor agregado, utilizada no tratamento de desordens malignas do sistema linfóide. A linhagem *Fusarium* sp. T22.2 selecionada em estudos anteriores mostrou elevado potencial para a produção dessa enzima,

tendo secretado atividade de 29,08 UI, uma produção maior do que a de muitos relatos da literatura. A linhagem não produziu atividade de L-glutaminase, uma característica interessante, pois a L-asparaginase bacteriana possui atividade secundária de L-glutaminase que ocasiona efeitos colaterais nos pacientes. A perspectiva de novos estudos pode resultar no desenvolvimento de um medicamento fúngico com menos propriedades adversas se comparado com as enzimas bacterianas atualmente disponíveis no mercado.

Além disso, muitos relatos da literatura apontam a produção da enzima L-asparaginase em meio suplementado com fontes de carbono de custo mais elevado, ou em meio complexo, cuja formulação é ainda mais dispendiosa, ao passo que a produção da linhagem T22.2 foi obtida em meio suplementado com glicerol, acrescido apenas de sais de fosfato e do substrato indutor. Tendo melhorado a produção, outra perspectiva é avaliar a atividade anticancerígena da L-asparaginase de *Fusarium* sp. T22.2 *in vitro* e *in vivo*, de modo a abrir caminho para o desenvolvimento de medicamento para tratamento de LLA com uma enzima eucarionte.

Em suma, essa pesquisa permitiu confirmar duas linhagens fúngicas capazes de produzir substâncias de alto valor agregado, contribuindo positivamente para a cadeia de biocombustíveis no Brasil, tanto pela possibilidade de conversão do glicerol a L-asparaginase, quanto pela perspectiva de fornecer uma rota biotecnológica para a produção de ácido málico a partir de sacarose, ao invés da obtenção a partir de petróleo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, S. *et al.* Method of producing Lmalic acid by fermentation. **US Patent** 3:063, 910, 1962.

ABI, N.; ROSTAMINEZHAD, P.; BEHNAMMOGH DAM, M.; RAHMANI, F. Management and treatment in acute lymphoblastic leukemia: A review article. **Adv Env Biology**, v.8, n. 10, p. 1642-1647, 2014.

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J-H. Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 35–54, 1998.

ALLEMANI, C. *et al.* CONCORD Working Group. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977-1010, 2015.

ALI, U. *et al.* L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 199-210, 2016.

ANDERSEN, M. R. Elucidation of primary metabolic pathways in *Aspergillus* species: orphaned research in characterizing orphan genes. **Brief Funct Genomics** 13(6):451–455, 2014.

ARDILA, J. A. R. **Otimização da produção da enzima anti-leucêmica L-asparaginase por *Penicillium* sp.** 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina MG, 2017.

BADOEI-DALFARD, A. L-asparaginase production in the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. **Molecular Biology Research Communications**, 5 (1), 1-10, 2016.

BARACHO, I. R.; COELHO, W. R. Environmental Factors Affecting Proportions of Binucleate Conidia in *Aspergillus niger*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v 74 (1), p. 65-68, 1980.

BARTNICKI-GARCIA, S. The evolution of fungal morphogenesis, a personal Account. **Mycologia**, v. 108, n. 3, 475-484, 2016.

BASKAR, G.; SAHADEVAN, R. Optimization of Culture conditions and Bench-Scale Production of L-Asparaginase by submerged Fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 923–929, 2012.

BATTAT, E. *et al.* Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermenter. **Biotechnol Bioeng.**, v. 37, p. 1108–1116, 1991.

BATHOORN, E. *et al.* Involvement of the opportunistic pathogen *Aspergillus tubingensis* in osteomyelitis of the maxillary bone: a case report. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 59, 2013.

BATOOL, T. *et al.* A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900–923, 2016.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D., P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Quim. Nova**, v. 34, n. 2, p. 306–319, 2011.

BERCOVITZ, A. *et al.* Localization of pyruvate carboxylase in organic acid producing *Aspergillus* strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, p. 1594–1597, 1990.

BIZZARI, S., BLAGOEV, M., MORI, H. Glycerin, Chemical Economics Handbook. SRI 2018. Disponível em: < <https://ihsmarkit.com/products/glycerin-chemical-economics-handbook.html> >. Acessado em 24/06/2019.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426–38, 2011.

BONATELLI, R., J.; AZEVEDO, J. Improved Reproducibility of citric acid production in *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 4, p.761–766, 1982.

BOLDRINI. Disponível em < <http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/apos-troca-demedicacaocrianças-temtratamento-de-leucemia-afetado-no-boldrini.ghtml> >. Acesso em: 22/11/2019.

BOWMAN, S., M.; FREE, S., J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p.799–808, 2006.

BROCK, P. M.; DÖRING, H.; BIDARTONDO, M. I. How to know unknown fungi: the role of a herbarium. **The new phytologist**, v. 181, n. 3, p. 719–24, 2009.

BROWN, S. H. *et al.* Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. **Appl Microbiol Biotechnol** , v. 97, p. 8903–8912, 2013.

BUABAN, B. *et al.* Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **J Biosci Bioeng**, v.110, p. 18–25, 2010.

BURKI, F. The Eukaryotic Tree of Life from a Global Phylogenomic Perspective. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 5, p. a016147–a016147, 2014.

CACHUMBA, J. *et al.* Biotechnology and industry microbiology current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 77–85, 2016.

CARVALHO, W. *et al.* Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa: Ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, n.18, 2005.

CASA, R., T., *et al.* Podridão radicular em feijão no sistema plantio direto. **Revista de Ciências Agroveterinárias. Lages**, v.10, n.1, p. 37–43, 2011.

CASTELANI, A. The water cultivation of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 283-284, 1963.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 201, p. 1251–1262, 2004.

CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em < www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 5/11/2019.

CHAMBERGO, F., S.; VALENCIA, E. Fungal biodiversity to biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.100, p. 2567–2577, 2016.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 95, p. 13–27, 2012.

CHOI, WJ. Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. **Recent Patentson Biotechnology**, v. 2, p.173–80, 2008.

CHOLET, C. *et al.* Tartaric acid pathways in *Vitis vinifera* L. (cv. Ugni blanc): a comparative study of two vintages with contrasted climatic conditions. **BMC Plant Biology**, v. 16, p. 144, 2016.

CONCEIÇÃO, D. M. *et al.* Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, p.99-106, 2005.

DESPHANDE, M., CHOUBEY, P., AGASHE, M. Studies on Optimization of Growth Parameters for L-Asparaginase Production by *Streptomyces ginsengisoli*. **The Scientific World Journal**, 2014.

DEMAIN, A. L. Microbial technology. **Trends in Biotechnology**, 18, p. 26-31, 2000.

DEZAM, A. P. G. *et al.* Microbial production of organic acids by endophytic fungi A.P.G. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282-287, 2017.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnol Bioeng**, v. 94, p. 821-9, 2006.

DIJKSTERHUIS, J., HOUBRAKEN, J., SAMSON, R., A. Fungal Spoilage of Crops and Food. **Agricultural Applications**, 2013.

DILOKPIMOL, A., *et al.* Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. **Biotechnol Biofuels**, p. 9-231, 2016.

DU, L.; LOU, L. PKS and NRPS release mechanisms. **Nat Prod Rep**, v. 27, p. 255–278, 2009.

DUVAL, M. *et al.* Comparison of *Escherichia coli*–asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European

Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, p. 2734–2739, 2002.

EBERSBERGER, I.; MATOS SIMOES, R. DE; KUPCZOK, A. A consistent phylogenetic backbone for the fungi. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 5, p. 1319–34, 2012.

EL BONDKLY, A.M.; EL-GENDY, M. M. Cellulase production from agricultural residues by recombinant fusant strain of a fungal endophyte of the marine sponge *Latrunculia corticata* for production of ethanol. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 331–346, 2012.

EGLER, R.; AHUJA, S.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 7, p. 62, 2016.

EMADI, A.; ZOKAEE, H.; SAUSVILLE, E. A. Asparaginase in the treatment of non - ALL hematologic malignancies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 73, p. 875–883, 2014.

EMEKA G. *et al.* Isolation of citric acid-producing fungi and optimization of citric acid production by selected isolates. **Global Journal of BIO-Science & Biotechnology**, v.1, p. 261-270, 2012.

EINSFELDT, K. *et al.* Recombinant L-Asparaginase from *Zymomonas mobilis*: A Potential New Antileukemic Agent Produced in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 11, 2016.

ENSIGN, S. Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 274–276, 2006.

FDA Approved Drug Products. Disponível em: <
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>>. Acesso em: 5/11/2019.

FERNANDEZ, C. A. *et al.* Successful challenges using native *E. coli* asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated *E. coli* asparaginase. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 73, p. 1307–1313, 2014.

FERNANDES, E. N.; BOAVENTURA, F. R. Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, p. 380-386, 2006.

FOX, E. M.; HOWLETT, B. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, p. 481–487, 2008.

FRIES E. Systema mycologicum 1. **Mauritius, Gryphiswaldae**, 1821

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 2004, p. 1–174, 2004.

FRISVAD, J. C. *et al.* Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **PLoS one**, v. 6, p. 1-6, 2011.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and Other Pathogenic Species in *Aspergillus* Section *Fumigati*. **Front Microbiol.** V. 6, p.1485, 2016.

GESSLEIN, B. W. Humectants in personal care formulation: a practical guide. In: Schueller R, Romanowski P, editors. Conditioning agents for hair and skin. **Marcel Dekker**, p. 95–6, 1999.

GOLDBERG, I.; ROKEM, J. S. Organic acids: old metabolites, new themes. **J Chem Technol Biotechnol**, 81, p. 1601–1611, 2006.

GONÇALVES, A. B. **Assimilação de nitrogênio e crescimento apical em fungos filamentosos produtores de L-asparaginase**. 125 p. Dissertação (Mestrado na área de Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina MG, 2016.

GONÇALVES, A. *et al.* Fungal production of the anti-leukemic enzyme L-asparaginase: from screening to medium development. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 38, p. 387-394, 2016.

GOLDBERG, I; ROKEM, JS; PINES, O. Organic acids: old metabolites, new themes. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 81, p. 1601–1611, 2006.

GOULART, R.; MARIN, J. Reversion by calcium of a yeast-like development to the original filamentous form, of the 10v10 5-fluorocytosine-sensitive mutant of *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 301-306, 2005.

GRAHAM, M. L. Pegaspargase: A review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1293–1302, 2003.

GUPTA, V. K. *et al.* Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends Biochem Sci**, v. 41, p. 633–645, 2016.

GUTIÉRREZ-ROJAS, I.; MORENO-SARMIENTO, N.; MONTROYA, D. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. **Rev Iberoam Micol**, v. 32, p. 1–12, 2015.

HAWKSWORTH, D. L.; SUTTON, B. C.; AINSWORTH, G. C. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. **Commonwealth Mycology Institute**, 1983.

HORN, B. W. *et al.* Sexual reproduction in *Aspergillus tubingensis* from section Nigri. **Mycologia**, v. 105, p. 1153–63, 2013.

HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. B. Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti*. **International Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 108-119, 2011.

HUNT, J.A. A short history of soap. **The Pharmaceutical Journal**, v. 263, p. 985–9, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil. Rio de Janeiro, 2016.

JOHNSON, E. *et al.* Consolidating biofuel platforms through the fermentative bioconversion of crude glycerol to butanol. **World J Microbiol Biotechnol**, p. 32:103, 2016.

JONES, M. G. The first filamentous fungal genome sequences: *Aspergillus* leads the way for essential everyday resources or dusty museum specimens? **Microbiology**, v. 153, p. 1–6, 2007.

KALLITHRAKA, S.; BAKKER, J.; CLIFFORD, M. N. Red Wine and Model Wine Astringency as Affected by Malic and Lactic Acid. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 416-420, 1997.

KEGG. Disponível em <https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00630 > . Acesso em: 5/11/2019.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* Species on Stored Products. **Wallingford: CAB International**, v. 161, p. 188, 1989.

KREDICS, L. *et al.* Infectious keratitis caused by *Aspergillus tubingensis*. **Cornea**, v. 28, p. 951–4, 2009.

KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in *Aspergillus*. **Studies in Micology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

KRITSUNANKUL, O.; PRAMOTE, B.; JAKMUNEE, J. Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine. **Talanta**, v.79, p. 1042-1049, 2009.

LACAZ, C. da S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.. **Micologia médica**. 7. ed. São Paulo: Sarvier, 1992.

LAMBONI, Y *et al.* Diversity in Secondary Metabolites Including Mycotoxins from Strains of *Aspergillus* Section *Nigri* Isolated from Raw Cashew Nuts from Benin, West Africa. **PLoS ONE**, v. 11, p. 10, 2016.

LANGE L. The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. **IMA Fungus**, v. 5, p. 463–471, 2014.

LANVERS-KAMINSKY, C. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 79, p. 439–450, 2017.

LEONEL, E. *et al.* Aproveitamento da glicerina proveniente da produção de biodiesel na obtenção de híbrido de caulinita para adsorção de Cr^{3+} . **Quim. Nova**, v. 35, p. 1407-1411, 2012.

LEONEL, M., CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, v.52, n.2, 1995.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The Fusarium laboratory manual. **Ed. Wiley-Blackwell**, 388p., 2006.

LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-683, 1970.

LIAUD, N. *et al.* Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. **Fungal Biology and Biotechnology**, p.1:1, 2014.

LIMA, L. L. A.; SCHULER, A.; GUERRA, N. B. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, p. 1186-1189, 2010.

LINK, H. F. Observationes in ordines plantarum naturalis. **Dissetatio I. Mag. Ges. Naturf. Freunde**, v. 3, p. 3–42, 1809.

LOPES, A. M. *et al.* Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p. 82-99, 2015.

LUHANA, K.; DAVE, A.; PATEL, U. Production, Purification & Characterization of Extracellular L-Asparaginase (Anti Cancerous Enzyme) From *Aspergillus niger*. **International Journal of Chemtech Applications**, v. 2, p.14-25, 2013.

MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. **Kluwer**, p. 307–340, 2004.

MAHAJAN, R. *et al.* Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresource Technology**, V. 125, P. 11–16, 2012.

MANGER-JACOB, F. *et al.* Isolation and sequencing of a new glucoamylase gene from an *Aspergillus niger* aggregate strain (DSM 823) molecularly classified as *Aspergillus tubingensis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 267–75, 2005.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase From *Escherichia Coli*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 105, p. 450–452, 1964.

MAX, B. *et al.* Biotechnological production of citric acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 862-875, 2010.

MCLAUGHLIN, D. J. *et al.* The search for the fungal tree of life. **Trends in microbiology**, v. 17, p. 488–9, 2009.

MEHER, L.; SAGAR, D.; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. **Renew Sustain Energy Rev**, v. 10, p. 248–268, 2006.

MILLIS, N.F. The organisms of biotechnology. In: Moo-Young M. **Comprehensive Biotechnology**, v.1, 1985.

MIROCHA, C. J.; CHRISTENSEN, C. M.; NELSON, G. H. Physiologic Activity of Some Fungal Estrogens Produced by *Fusarium*. **Cancer Research**, p. 2319–2322, 1968.

MOLINA, G. *et al.* Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. **Food Chem** 174:606–613, 2015.

MONTEIRO, M. R. *et al.* Glycerol from biodiesel production: technological paths for sustainability. **Renew. Sustain. Energy Rev.** **88**, 109–122, 2018.

MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. **Universidade Federal de Lavras**, 625 p., 2002.

MOSSERAY, R. *Aspergillus stubingensis*. **La Cellule** v. 43, p. 245-247, 1934.

MOLVIEW. Disponível em: <molview.org>. Acesso em 5/11/2019.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, p. 97–113, 1998.

MURAZA, O. Peculiarities of Glycerol Conversion to Chemicals Over Zeolite-Based Catalysts. **Front. Chem.** v. 7, p. 233, 2019.

NAGY, L. G. *et al.* Six Key Traits of Fungi: Their Evolutionary Origins and Genetic Bases. **Microbiol Spectrum**, v. 5, p. 4, 2016.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l - asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, p. 208–221, 2007.

NELSON, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAÏSSIE, E. J. American Society for Microbiology Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Speciest. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 479-504, 1994.

NÉRI-NUMA, I. A. *et al.* Industrial additives obtained through microbial biotechnology: biosurfactants and prebiotic carbohydrates. **CABI Publishing**, p. 528–548, 2016.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

NOVAKI, L. *et al.* Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **Engvista**, v. 12, n. 2. p. 131-140, 2010.

OCHSENREITHER, K. *et al.* Process characterization and influence of alternative carbon sources and carbon-to-nitrogen ratio on organic acid production by *Aspergillus oryzae* DSM1863. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 5449–5460, 2014.

OLIVEIRA, J. M. F.; GRAAFF, L. H. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 225–237, 2011.

PARIS, L. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. 128 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2008.

PASSARINI, M. R. Z. **Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e da produção de antimicrobianos por fungos filamentosos isolados de invertebrados marinhos**. Dissertação. Mestrado pela Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PASTORE, N. S.; HASAN, S. M.; ZEMPULSKI, D. A Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engevista**, v. 13, n. 3, p. 149-159, 2011.

PATIDAR, M. K. *et al.* Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. **Biotech**, v 8, p.199, 2018.

PESSÔA, M. G. *et al.* Fusarium species—a promising tool box for industrial biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, p. 3493–3511, 2017.

PLASSARD, C.; FRANSSON, P. Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi. **Fungal biology reviews**, v. 23, p. 30-39, 2009.

QUISPE, C. A. G., CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, J. A. JR. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Energy Rev.**, v. 27, p. 475–493, 2013.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. **Baltimore: Williams & Wilkins**, p. 686, 1965.

RAIMBAULT, M., ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 199-209, 1980.

RAOL, G.,G. *et al.* Utilization of agro-industrial waste for b-galactosidase production under solid state fermentation using halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1 isolate. **Biotech**, v. 5, p. 411–421, 2015.

RELWANI, L.; KRISHNA, P.; REDDY, M. S. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Phosphate Solubilization by a Wild-Type Strain and UV-Induced Mutants of *Aspergillus tubingensis*. **Curr Microbiol**, v. 57, p. 401–406, 2008.

REN21, T. “Renewables 2018 Global Status Report”. **GSR**, 2018.

RIBEIRO, M. C.; STELATO, M. M. **Microbiologia prática: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica : bactérias, fungos e vírus**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. The acidity in the vinification of Isabella, Cabernet Sauvignon, and Cabernet Franc Red grapes. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, 2002.

RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Tartaric and malic acids in the must grapes of Bento Gonçalves-RS, Brazil. **Ciência Rural**, v. 37, n.3, 2007.

RODRIGUES, A. C. A. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos para produção de amilases e celulases**. 73 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011.

RUGSASEEL, S.; KIRIMURA, K.; USAMI, S. Citric acid acculation by cycloheximide-sensitive mutant strains of *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 45, p. 28-35, 1996.

RYWIN'SKA, A. *et al.* Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 26, p.1217–1224, 2010.

SANTOS, R., S. *et al.* holocellulolytic hydrolases production by filamentous fungi using oil cakes as substrate. **International Journal of Development Research**, v. 09, p. 28358-28363, 2019.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical mycology**, v. 47, p. 13–20, 2009.

SCHERER, R. *et al.* Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1137-1140, 2008.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Appl Microbiol Biotechnol**, v 65, p. 363–372, 2004.

SCHNEIDER, M.; ZIMMER, G.; CREMONESE, E.; *et al.* By-products from the biodiesel chain as a substrate to citric acid production by solid-state fermentation. **Waste Management & Research**. V. 32, p. 653–660, 2014.

SERGEEVA, Y. *et al.* Lipids of filamentous fungi as a material for producing biodiesel fuel. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, v. 44, p. 576–581, 2008.

SHANTHIPRIYA, A. *et al.* Factors influencing L-asparaginase Production by Three Thermophilic Caprophilous Fungi. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 5, p. 1242–1248, 2015.

SHIRIVASTA, A. *et al.* Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Onco Hematol**, v. S1040, p. 1–12, 2016.

SHOW, P. L. *et al.* Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Life Sci.**, v. 8, p. 271–283, 2015.

SIDDIQUI KS. Some like it hot, some like it cold: temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes. **Biotechnol Adv**, v. 33, p. 1912–1922, 2015.

SINGH, R. *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **Biotech**. p. 6-174, 2016.

SILVA, T. J. **Crescimento apical e síntese de carboidrases em fungos filamentosos: uma análise bioquímica e morfológica**. 166 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina MG, 2014.

SILVA, T. J. **Seleção de fungos filamentosos para fermentação cítrica de glicerina residual da produção de biodiesel**. 87 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011.

STAJICH, J. E. *et al.* The Fungi. **Current Biology**, v. 19, p. 840–845, 2009.

STELMACHOWSKI, M. Utilization of glycerol, a by-product of the transesterification process of vegetable oils: a review. **Ecological Chemistry and Engineering's**, v. 18, p. 9–30, 2011.

SUSCA, A. *et al.* Multilocus sequence analysis of *Aspergillus* Sect. Nigri in dried vine fruits of worldwide origin. **International journal of food microbiology**, v. 165, p.163–8, 2013.

TAKESHITA, N. Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, p.1693-1699, 2016.

TIMON, T.; WYATT, HAN; WÖSTEN, JAN. Fungal Spores for Dispersion in Space and Time. **Advances in Applied Microbiology**, v. 85, p. 43-91, 2013.

UNIPROT PAGE. Disponível em < <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A087FW24>>. Acesso em: 5/11/2019.

VACHHANI, J., DESAI, B. Isolation, identification and production of L-asparaginase producing bacteria from soil. **BMR Microbiology**, 4 (1), 1-6, 2018.

VARGA, J. *et al.* New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. **Studies in mycology**, v. 69, n. 1, p. 1–17, 2011.

WALLEN, R. M.; PERLIN, M. H. An Overview of the Function and Maintenance of Sexual Reproduction in Dikaryotic Fungi. **Front. Microbiol**, v. 9, p. 503, 2018.

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnol Adv**, v. 30, p. 1447–1457, 2012.

WAKIL, S. M., ADELEGAN, A. A. Screening, production and optimization of L-asparaginase from soil bacteria isolated in Ibadan, South-wertern Nigeria. **Journal of Basic & Applied Sciences**, 11, 39-51, 2015.

WEST, T. P. Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species. **Biotechnol Lett**, v. 33, p. 2463–2467, 2011.

WEHMER, C. Zur Charakteristik des citronensauren Kalkes und einige Bemerkungen über die Stellung der Citronensäure im Stoffwechsel. **Plant biology**, v.11, n. 6, 1893.

WERPY, T.; PETERSEN, G. Top value added chemicals from biomass: I. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. **US Department of Energy, Washington**, 2004.

WILSON, A. M. *et al.* It's All in the Genes: The Regulatory Pathways of Sexual Reproduction in Filamentous Ascomycetes. **Genes**, v.10, p. 330, 2019.

WOESE, C. R.; KANDLERT, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 4576–4579, 1990.

WYATT, T. T., WÖSTEN, H. A B., DIJKSTERHUIS, J. Fungal Spores for Dispersion in Space and Time. **Advances in Applied Microbiology**, v. 85, p. 43-91, 2013.

WU, B. *et al.* Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127-140, 2019.

XU, Y. *et al.* Development of a Cre-loxP-based genetic system in *Aspergillus niger* ATCC1015 and its application to construction of efficient organic acid-producing cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8105–8114, 2019.

YANG, L., LUBECK, M., LUBECK, P.S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. **Fungal Biol. Rev.**, v. 31, p. 33–49, 2017.

ZHENGY *et al.* Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 50, 2012.

ZHOU, J. J. *et al.* Stability and oscillatory behavior of microbial consortium in continuous conversion of crude glycerol to 1,3-propanediol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V. 102, p. 8291–8305, 2018.

ZUO, S. *et al.* Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable l-asparaginase during French fries processing. **Extremophiles**, v. 19, p. 841–851, 2015.

SHAOHUA, Z. *et al.* Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable l-asparaginase during French fries processing. **Extremophiles**, v. 19, p. 841–851, 2015.

8 APÊNDICE

8.1 ARTIGOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS

8.1.1 Artigo I

ACCUMULATION OF MALIC ACID AND OTHER INDUSTRIALLY IMPORTANT ORGANIC ACIDS BY *Aspergillus tubingensis* AN1257

COELHO, S. V. B.; SANTOS, A.S; VANZELA, A.P.F.C.

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina – MG, Brasil.

ACCUMULATION OF MALIC ACID AND OTHER INDUSTRIALLY IMPORTANT ORGANIC ACIDS BY *Aspergillus tubingensis* AN1257

Suedali Villas Bôas Coelho ^(*), Alexandre Soares dos Santos and Ana Paula de Figueiredo
Conte Vanzela

Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys – Diamantina MG - Brazil, (+55) 38 99837-1109, suebarata@yahoo.com.br ^(*)

‘Declarations of interest: none’.

ABSTRACT

Organic acids act as acidifiers which improve sensorial characteristics of beverages, contributing to color, aroma, and taste. Malic acid is one of the industrially important acidifiers, and is also applied in metal cleaning. There is a challenge to establish biotechnological processes for its accumulation. One approach to improve production is searching for better strains, which be adequate for bioconversion and product accumulation from cheaper substrates. The present work aimed to identify a panel of organic acids produced by *Aspergillus tubingensis*, which has shown high biotechnological potential due to the ability of producing a variety of enzymes and of utilizing several substrates. *A. tubingensis* AN1257 was compared to a standard organic acid producer, *Aspergillus niger* 10v10. Secretion of organic acids in dependence of the carbon source concentration, time, and pH was evaluated, and the acids produced were detected and quantified by potentiometric titration and by HPLC. Several industrially important organic acids were accumulated by this strain, including citric and malic acids, with the production being affected by culture variables. Culture pH influenced the quantity and type of acid production by strain AN1257. It was able to convert sucrose to malic acid in submerged bioprocesses, accumulating these industrially important acid in very simple media and culture conditions, posing in perspective the establishment of its biotechnological obtention.

KEYWORDS: Organic acids, filamentous fungi, biotechnology

INTRODUCTION

Organic acids occur naturally in food, being originated from biochemical processes, hydrolysis, and microbial growth. In wines, these acids originate from grapes (tartaric, malic and citric acids) and from the processes of alcoholic and malolactic fermentations (lactic and succinic acids), contributing to color, aroma, and taste, as well as for microbiological and chemical stability (Kallithraka et al., 1997; Rizzon & Sganzerla, 2007).

Malic acid is used as acidifier in foods, in metal cleaning, textile manufacturing, as additive in pharmaceutical products, medical infusions and in paints (Goldberg *et al.*, 2006). The 1,4-dicarboxylic acids, like succinic, malic, and fumaric, are not only produced by all living organisms, being part of the tricarboxylic acid cycle (TCA), but have also been identified among the 12 chemical products of higher value that can be obtained from biomass, according to the Department of Energy of the United States (Werpy & Petersen, 2004).

Among the biotechnological producers, filamentous fungi are of great importance, once they are able to accumulate a variety of economically valuable substances, including enzymes, vitamins, organic acids, antibiotics, and other bioactive compounds and additives for the pharmaceutical, alimentary, chemical, and biotechnological industries (Andersen, 2014; Lange, 2014). Certain genera of filamentous fungi, like *Rhizopus* and *Aspergillus*, are known for the production and secretion of large amounts of fumaric and malic acid, when cultivated under stressing conditions (Abe *et al.*, 1962; Battat *et al.*, 1991; Magnuson & Lasure, 2004). Some of the black *Aspergilla* are able to secrete higher amounts of organic acids, i.e., *Aspergillus niger* (Papadaki & Mantzouridou, 2019). A strain of *Aspergillus tubingensis*, a species widely spread in the whole world, was isolated in Diamantina-MG, Brazil, and has shown potential to produce endoglucanases and hemicellulases from plant biomasses (Santos *et al.*, 2015).

Although filamentous fungi are known producers of organic acids, there are no commercial production established for some of these, due to lack of economic viability. Fumaric and malic acids, for instance, are still obtained from petroleum (Ochsenreither *et al.*, 2014). Genetic engineering of *A. niger* allowed the production of malic acid in elevated quantities, attaining almost 70% the theoretical yield of bioconversion from glucose (Brown *et al.*, 2013). Other authors also applied genetic engineering of *A. niger* to produce high amounts of malic acid in fed-batch processes (Xu *et al.*, 2019). However, complex media were used for production, requiring not only glucose in high concentration and regular supplementation, but also an expensive supplement like peptone, and micro-nutrients.

Biochemical and genetical regulatory mechanisms can be obstacles to accumulate intermediate metabolites by natural not engineered strains. Good producers, however, could be searched among more than 12 million fungal species that are estimated to exist (Wu *et al.*, 2019), provided the suitable culture conditions be developed. Molecular improvement of producer strains is a high valuable approach to increase production, but also poses environmental and health-threatening questions, since many of the molecular markers utilized for their preparation are genes conferring resistance to antimicrobials. As metabolism regulation vary among species and strains, another useful approach is the screening for microorganisms able to convert carbon sources to a desirable product, and further investigate culture conditions overcoming feed-back inhibition of the productive pathways.

In this work, a strain of *A. tubingensis* AN1257, previously studied by its ability of producing enzymes and of converting alternative substrates, was investigated to determine a gama of organic acids produced. Further, variables interfering in the production, i.e. concentration of carbon source, time of cultivation, and pH were investigated and varied to increase acid accumulation in batch processes.

MATERIALS AND METHODS

Strain cultivation and maintenance

A. tubingensis AN1257 and *A. niger* 10v10 were replicated in Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated for 7 days at 30 °C, before harvesting conidia to be used as inocula. For maintenance, small blocs of agar covered by mycelium were submerged in sterile distilled water contained in 2 mL micro tubes, and stored under refrigeration (4 ± 1 °C). Stocks were replaced at every 6 months (Castelani, 1963).

Screening the production of organic acids

The potential of *A. tubingensis* AN1257 for organic acid production was screened in solid media and compared to a known acid producer, *A. niger* 10v10. For semi-quantitative determination of total acid production, solid media ($120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose; $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 ; $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 ; $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar) was prepared and supplemented with bromocresol green at $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ as indicator; pH was adjusted at 4.0 and 6.0. Conidia from 7 days colonies cultivated in PDA at 30 °C were collected in sterile distilled water and diluted to a concentration of 50 conidia in 10 μL , which were deposited in the centre of a Petri dish containing the screening medium. Cultures were incubated at 30 °C for 7 days. Colony diameter for radial growth determination, and the acidic halo for estimation of total acid

production were measured in two directions for 7 days at 24 h intervals. Acid formation index (IA) was calculated by the ratio among the diameters of the acidic halo and the colony diameter. IA was determined as media of three independent cultures.

Central composite design for organic acid production by submerged cultivation

Concentration of carbon source (sucrose) and pH were investigated as independent variables of Central Composite Design, (CCD) in order to determine the conditions influencing organic acid production by *A. tubingensis* AN1257. Four bioprocesses combining the lowest and highest levels of each variable were designed, in which the concentration of sucrose varied from 60 to 120 g . L⁻¹, and pH varied from 4 to 7. Another four processes were designed by combining the higher (132.4 g . L⁻¹ for sucrose; 7.62 for pH) and lower (47.7 g . L⁻¹ for sucrose and 3.37 for pH) axial levels of each variable with the central level of the other. The central point condition combined the medium level of both variables (90 g . L⁻¹ sucrose; pH 5.5). A total of 9 productive conditions were generated and used to investigate organic acid production by *A. tubingensis* AN1257 by submerged process, as shown in Table 1: SA to SD (high and low levels of sucrose and pH); SE to SH (axial conditions); SI to SL (replicates of the central point condition) (Table 1).

Table 1: Bioprocesses generated by Central Composite Design for organic acid production by *A.tubingensis* AN1257

Bioprocess	Sucrose (g . L ⁻¹)	pH
SA	60.0	4.0
SB	60.0	7.0
SC	120	4.0
SD	120	7.0
SE	47.57	5.5
SF	132.4	5.5
SG	90.0	3.37
SH	90.0	7.62
SI-SL	90.0	5.5

Other medium constituents were kept as simple as possible, including an inorganic primary nitrogen source [$3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], phosphate and potassium sources [$1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ and $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$]. Processes were conducted to contain three replicates of each condition, which were stopped after 3, 6, and 9 days. The central point processes were prepared in 3 replicates. A sample of each medium was collected before inoculation (zero time) for control. Cultures were inoculated with conidia to a final concentration of $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ and incubated at 30°C under 150 rpm.

Production of organic acids was determined by potentiometric titration and by high performance liquid chromatography (HPLC).

Potentiometric Titration

Samples of 1 mL were collected from each bioprocess and diluted with 19 mL of distilled water. Potentiometric titration was performed against NaOH [$0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] previously standardized with potassium acid biftalate, to determine medium acidity and the potential of *A. tubingensis* AN1257 for secretion of total acid under submerged cultivation. Analysis was performed by automatic titration in Titroline 7000 (SI Analytics). Titration equivalent volumes were determined by the derivative method (Harris, 2005).

Determination of organic acids by HPLC

Analyses were performed in chromatograph Shimadu, in a flow of $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, at 60°C , injection of $5 \mu\text{L}$, and detection at 220 nm. It was utilized a column Rezex ROA 30 x 9 for organic acids. Samples of 1.5 mL were removed from bioprocesses after 0, 3, 6, and 9 days of cultivation, and centrifuged at $10.000g$ for 5 minutes. An aliquot of $150 \mu\text{L}$ were collected from the supernatant and diluted (10x) in the eluent H_2SO_4 [0,005N]. After treatment, samples were placed in vials and injected.

RESULTS AND DISCUSSION

Screening the production of organic acids

Both *A. tubingensis* AN1257 and *A. niger* 10v10 showed good acid secretion in solid media. As shown in Figure 1, both strains secreted high amounts of acid, as indicated by the acidic yellow halo in each culture against the green color of the media. After 4 days of cultivation, *A. tubingensis* AN1257 showed good potential for acid secretion, when compared to the standard strain *A. niger* 10v10. After 7 days of cultivation acid secretion was so intense that the whole media were acidified in cultures of both strains, either in pH 4 or 6. Starting

cultures at pH 6 decreased the index of acidification, yet the strains showed good ability to secrete acids enough to form large halos covering most of the area of the dish after 4 days (Figure 1).

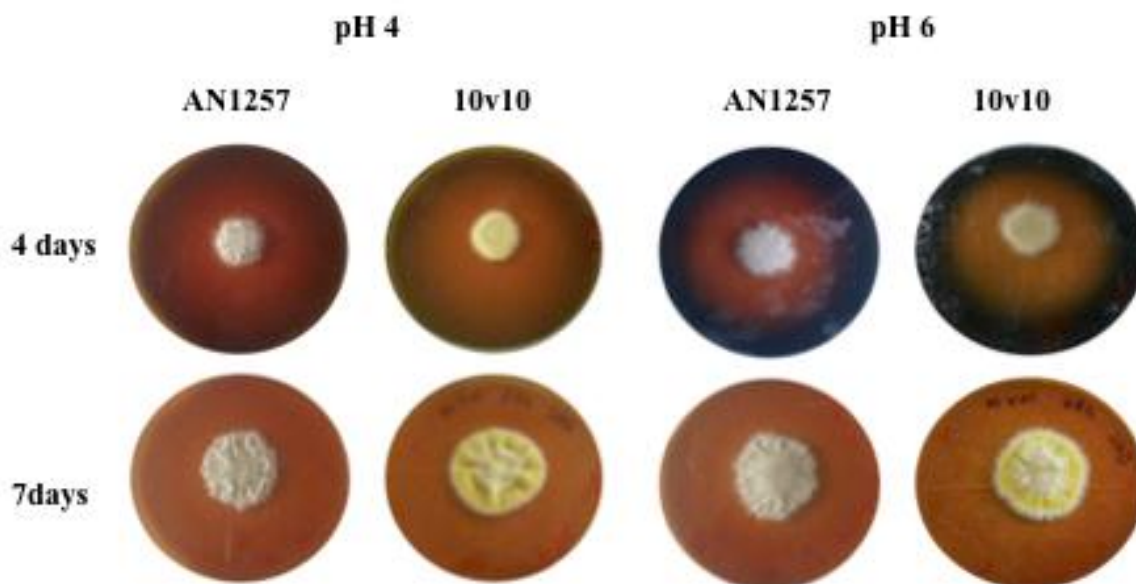


Figure 1: Cultivation of *A. tubingensis* AN1257 and *A. niger* 10v10 in media to evaluate acid secretion. Media were supplemented with sucrose as the sole carbon source, and pH was adjusted for pH 4 and pH 6. Cultures were incubated at 30 °C and observed daily to measure the radial growth and the acid halo diameter. Cultures of 4 and 7 days are shown.

Thus, *A. tubingensis* AN1257 presented very high potential for acid secretion, so does *A. niger* 10v10. After determining colony diameter and acidity halo, the index of acid formation (IA) was calculated for each time of cultivation. Curves for radial growth and IA are shown in Figure 2.

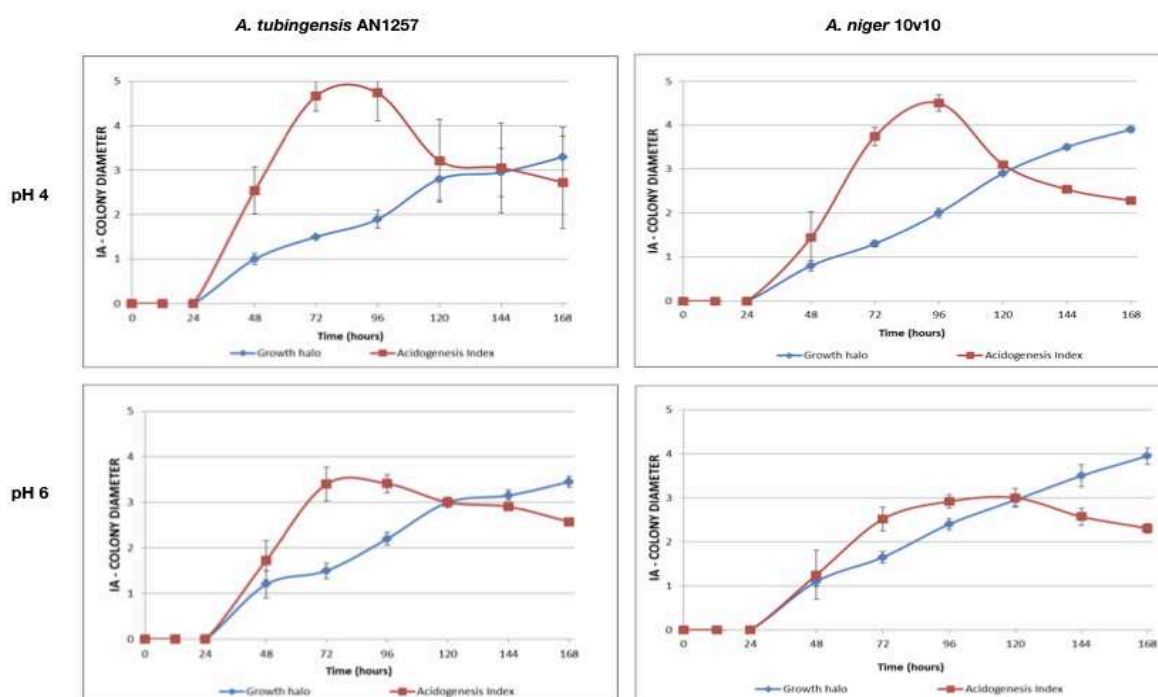


Figura 2: Growth and index of acid secretion (IA) of *A. tubingensis* AN1257 and *A. niger* 10v10 cultivated in pH 4 and 6. Cultures were prepared in media supplemented with sucrose as the sole carbon source, inoculated with 50 conidia at the center, and incubated at 30 °C. Radial growth and acidity halo were measured daily. IA is expressed as the ratio among the diameters of the acidity halo and the colony.

According to Max *et al.* (2010) and Yang *et al.* (2017) different species of *Aspergillus* like *A. wenti*, *A. foetidus*, *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. fonsecaeus*, *A. phoenicis*, and *A. carbonarius* have been shown to be good producers of citric and other acids. Here we show that *A. tubingensis* is also a good acid producer, secreting acidity in a magnitude that encouraged evaluation of the panel of acids which could be produced in a liquid process. Elucidation of the variety of acids produced by a fungus is not only important for biotechnological applications, but is also useful as a tool for species identification, which is particularly difficult among black aspergilla.

Dezam *et al.* (2017) also screened 6 fungal general for organic acid production by Solid State Fermentation (SSF), utilizing sucrose as carbon source and bromocresol green as pH indicator. Acidification of the media and formation of a yellow halo around inocula was used as indicative of organic acid secretion. Their screening showed that only the genera *Aspergillus* and *Fusarium* were suitable for acid secretion.

Either *A. tubingensis* AN1257 and *A. niger* 10v10 started measurable radial growth after 24 h. Both strains grew until 168 h, showing good adaptation to the conditions utilized for cultivation and acid secretion, including pH 4 or 6, sucrose as carbon source, and ammonium sulphate as nitrogen source (Figure 2). Maximum IA produced by *A. tubingensis* AN1257 was determined after 72 h of cultivation either in medium adjusted for pH 4 or 6. *A. tubingensis* AN1257 showed more potential for acid secretion than strain 10v10, once the maximum IA of the later was obtained after 96 h, and was lower than the IA of strain AN1257 during the whole period studied. Analysis of Figure 2 allowed to conclude that *A. tubingensis* AN1257 could be investigated as an acid producer in submerged processes, once it yielded a high IA of near 5 when cultivated in the conditions similar to that utilized for citric acid fermentation. As shown, strain AN1257 overcame the standard citric acid producer *A. niger* 10v10.

Increasing pH from 4 to 6 impaired the index of acidification of both strains, decreasing IA in about 1.5 unit after 72 and 96 h of cultivation. As pH and pOH are logarithm scales, increasing the initial pH in 2 units (pH 4 to 6) increases the concentration of OH⁻ in media from 10⁻¹⁰ M to 10⁻⁸ M, meaning that the fungi had to secrete 100x more acid to acidify completely the media, in order to turn to the yellow color. Yet, both strains kept a high

index of acidification, especially strain AN1257, whose IA was above 3 after 72 and 96 h (Figure 2).

Organic acid production by *A. tubingensis* AN1257 in submerged processes

After designing conditions for organic acid production by submerged fermentation, as shown in Table 1, all processes were analyzed for the amount of acid produced after 0 (control), 3, 6, and 9 days of cultivation. Curves of potentiometric titration for processes SA, SB (6% sucrose), SG, SH (9% sucrose), and SC, SD (12% sucrose) are shown in Figure 3.

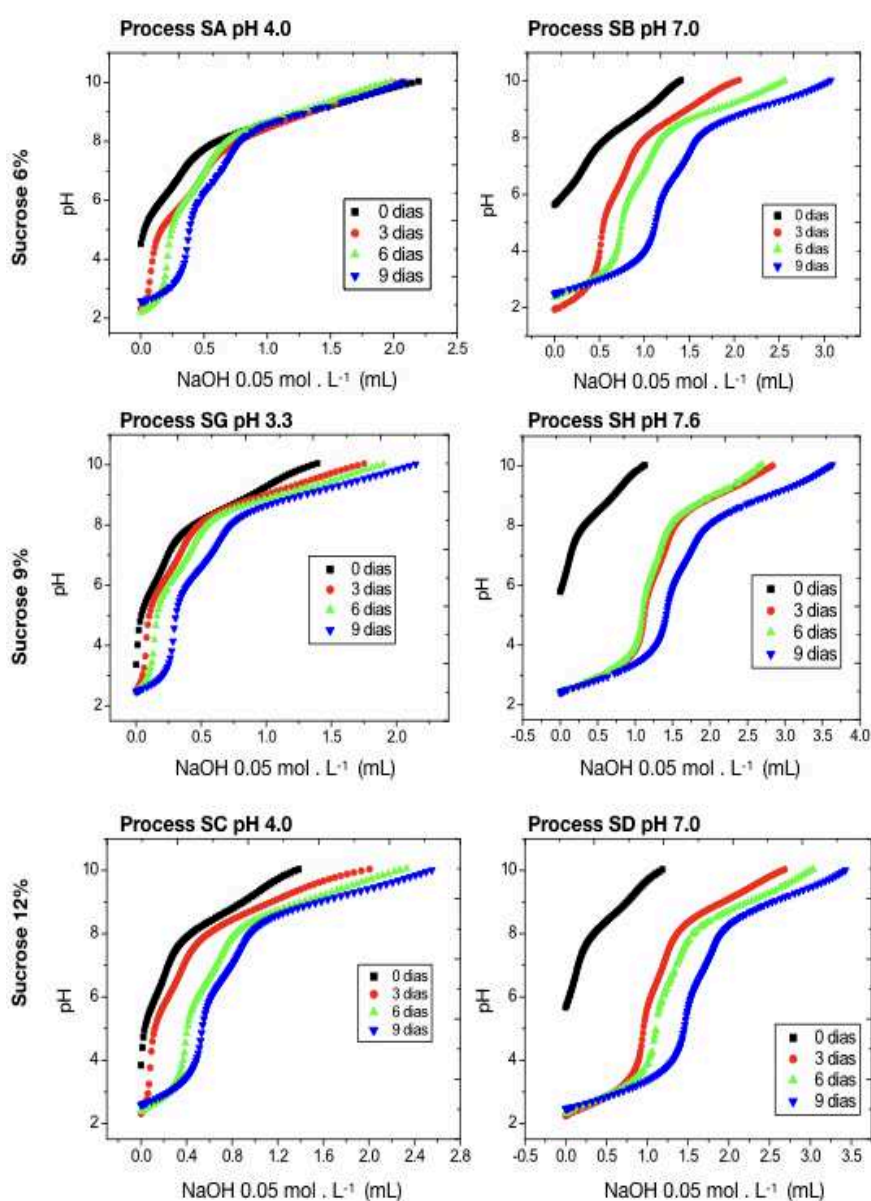


Figura 3: Total acid production by *Aspergillus tubingensis* AN1257 in submerged bioprocesses supplemented with sucrose at 6%, 9%, and 12% at acid pH and at pH near neutrality. Production of total acid was determined by potentiometric titration of culture supernatants after 3 (red), 6 (green), 9 (blue) days of cultivation. Zero time (black curve) is shown for each bioprocess as control (media not inoculated).

Potentiometric determination of pH in samples collected at zero time of each culture (control) showed that the initial pH adjusted in these media was decreased in samples collected after 3, 6, and 9 days of cultivation, as can be seen from titration curves before addition of NaOH (Figure 3). Control samples (zero time) show curves for potentiometric titration with two buffering regions, one that is near pH 6.0, which may be due to carbonate formation, and other near pH 9.0, due to the presence of phosphate and ammonium salts (Figure 3).

Analysis of samples collected from bioprocess SG (9% sucrose, initial pH 3.37) and SH (9% sucrose, initial pH 7.6) showed that after 3 days of cultivation, medium pH was decreased to approximately 2.5. In all bioprocesses, the culture media were acidified, showing pH values below 3 after 3 days of cultivation and on, as can be seen by comparing control samples (zero time) and samples collected after 3, 6, and 9 days of cultivation before starting titration with NaOH (Figure 3).

This comparison evidences acid secretion by strain AN1257 after 3 days in all conditions shown, similarly of results obtained in solid media (Figure 2). Independently of the amount of sucrose in the media, pH of samples collected after 3, 6, and 9 days of cultivation decreased in comparison to the initial pH (zero time), indicating the presence of acid products.

As expected from analysis of acid secretion in solid media, after fungal growth and acid secretion in submerged bioprocesses, medium pH was decreased, and the equivalence volume increased from 0.03 mL (3 days), 0.3 mL (6 days), to 0.5 mL (9 days) as seen in the titration curve of bioprocess SC (12% sucrose, pH 4.0) (Figure 3). When sucrose concentration is 12% and starting pH is 7, in bioprocess SD, acid production increased after 6 and 9 days of cultivation, once these samples presented higher resistance to pH elevation, with a weak buffering tendency observed in the beginning of titration (Figure 3). As shown, buffering was a little stronger in the sample collected from bioprocess SD after 9 days of cultivation. This indicates that at the higher sucrose concentration and at neutral initial pH, acid production was increased in the conditions of the present study.

It is important to consider that conidial germination in *Aspergillus* is influenced by pH, with better values ranging from pH 4.0 to 7.0. Thus, while acid secretion and medium acidification was observed in all cultures, the amount of acid produced may vary due to metabolic reasons and to germination and growth.

By means of the derivative method (supplementary material) it was possible to determine the volume of NaOH ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) needed to neutralize the acids produced, as well as to quantify the total acid amount (Figure 4).

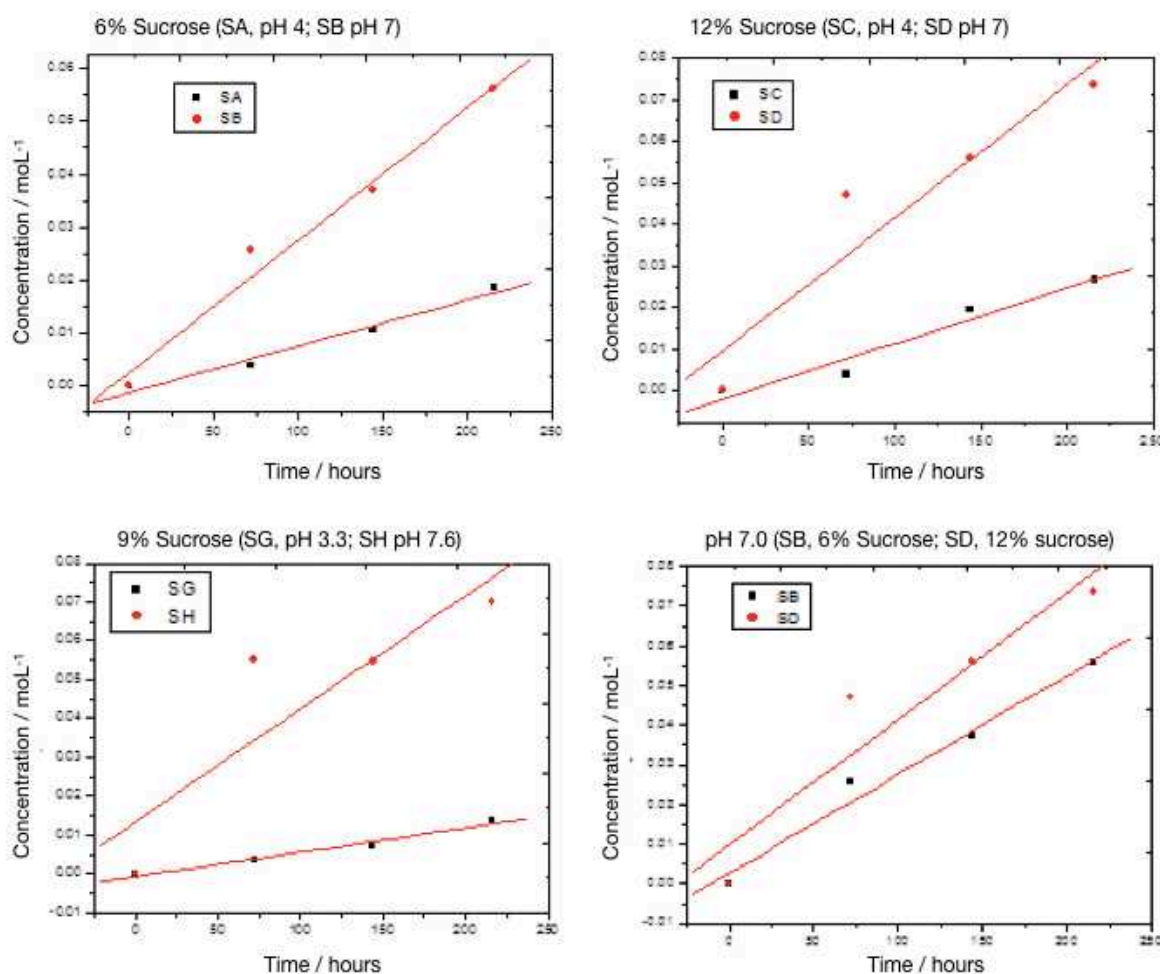


Figure 4: Effects of pH and sucrose concentration on acid production by *Aspergillus tubingensis* AN1257. Cultures were incubated at 30 °C for 3 (72 h), 6 (144 h), and 9 days (216 h). Samples were collected, titrated against NaOH 0.05 mol . L⁻¹ and the amount of total acid was estimated by the derivative method.

Graphical comparison of bioprocesses SA and SB, which were both supplemented with 6% sucrose, but at pH 4 and 7, respectively, allow to verify that acid production was higher in pH 7 ($2.5 \cdot 10^{-4}$ mol . L⁻¹) than in pH 4 (8.7×10^{-5} mol . L⁻¹), as shown in Figure 4. The same occurs when sucrose concentration is increased to 9% or 12%. Analysis of bioprocesses SC and SD, which were supplemented with 12% sucrose, show 2x more acid production at pH 7 (Bioprocess SD, $3.2 \cdot 10^{-4}$ mol . L⁻¹) than at pH 4 (Bioprocess SC, $1.3 \cdot 10^{-4}$ mol . L⁻¹). These analyses indicated that *A. tubingensis* AN1257 is more suitable for acid production at pH 7.0 or near neutrality (Figure 4). Investigating acid production at axial levels of pH (Bioprocess SG, pH 3.3 and Bioprocess SH, pH 7.6) and supplementing the media with 9% sucrose confirmed this tendency. The lowest amount of acid production was obtained in Bioprocess SG, as shown in Figure 4.

Considering neutral pH as the best condition for acid production by strain AN1257, sucrose concentration (Bioprocess SB, 6% sucrose; Bioprocess SD, 12% sucrose) was compared to determine its effect for acid production (Figure 4). As shown, increasing the sucrose concentration elevates acid production, which reaches $3.2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in bioprocess SD.

After determining the best conditions for acid production, samples were analyzed by HPLC for identification and quantification of each acid produced.

Determination of organic acids by HPLC

HPLC analysis of supernatants collected from submerged bioprocesses evidenced the presence of organic acids consistent to the standards citric, succinic, malic, lactic, and tartaric acids. Acetic and butyric acid were not detected.

Supernatant from Bioprocess SD, after 9 days of cultivation, was the best condition for total acid production, as shown in Figures 3 and 4. Analysis of this sample by HPLC is shown in Figure 5. Some pikes of organic acids were detected, with their retention times (RT) being compatible to citric acid [$0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] (TR 8.5 min.), malic acid [$13.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] (TR 10.2 min.), succinic acid [$0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] (TR 13.0 min.), and lactic acid [$0.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] (TR 14.3 min.). The final concentrations were calculated by multiplying by 10, once this was the dilution used for sample preparation.

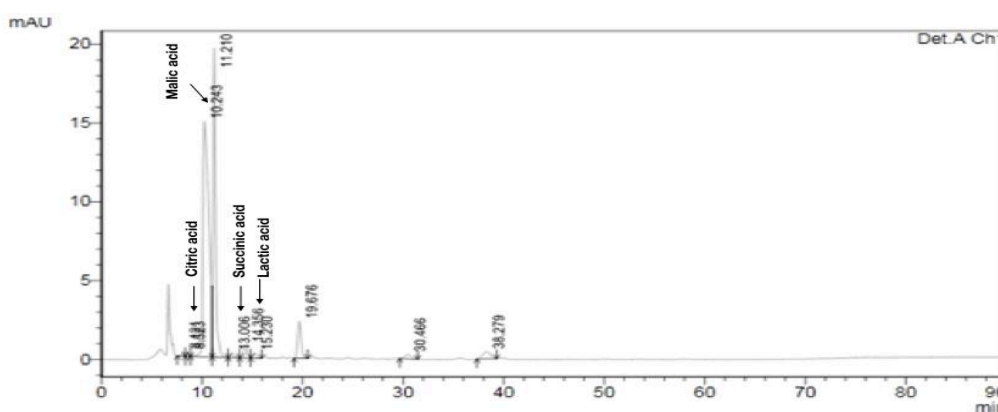


Figura 5: Analysis of Bioprocess SD (12% sucrose, pH 7) to detect the profile of organic acids produced by *A. tubingensis* AN1257. Sample was collected from supernatant after 9 days of cultivation at 30 °C and diluted 10x prior to analysis.

Other bioprocesses planned by CCD were also analyzed by HPLC, whose results are summarized in Table 2. There was considerable production of malic acid in some bioprocesses which were adjusted with initial pH 7.0, after 6 days of cultivation (Table 2).

However, when sucrose concentration is increased to 132.42 g . L⁻¹ (13.4%) (Bioprocess SF), malic acid production decreases (Table 2). This decrease in production could be due to the excess of carbon source, whose concentration would be reaching limiting values, or more probably may be due to the low initial pH, which was 5.5. It is widely known that citric acid production by filamentous fungi, especially by *A. niger*, is strongly influenced by pH, which must be near pH 2 during the active phase of production. Other acids, on the opposite, are produced near neutrality. Results in Table 2 show that malic acid production by *A. tubingensis* AN1257 occurs preferentially near neutral pH. It is possible to conclude that this species produces a panel of organic acids and presents potential to accumulate malic acid.

In bioprocess SB (6% sucrose, pH 7) the concentration of malic acid reached 8.30 g . L⁻¹ after 9 days of cultivation. The augment of sucrose to 9% increased malic acid production to 12 g . L⁻¹ after 9 days of cultivation, as determined in the supernatant of Bioprocess SH (pH 7.62). As seen in Table 2, further increase in sucrose concentration (12%) in Bioprocess SD (pH 7) correlated with the maximum concentration of malic acid: 13.6 g . L⁻¹ after 9 days of cultivation, what is in accordance to the titration and derivative analysis, which showed this condition to be the best for total organic acid accumulation (Figures 3 and 4).

Table 2: Production of organic acids by *Aspergillus tubingensis* AN1257 in bioprocesses planned by CCD.

Bioprocess	Time (days)	Sucrose (g . L ⁻¹)	pH	Citric acid (g . L ⁻¹)	Succinic acid (g . L ⁻¹)	Malic acid (g . L ⁻¹)	Lactic acid (g . L ⁻¹)	Tartaric acid (g . L ⁻¹)
SA	3	60.0	4.0	-	-	-	-	0.57
SA	6	60.0	4.0	0.15	0.37	0.32	0.70	0.55
SA	9	60.0	4.0	0.15	0.32	1.09	0.77	0.49
SB	3	60.0	7.0	-	-	2.40	0.67	0.56
SB	6	60.0	7.0	-	0.29	0.56	0.72	0.57
SB	9	60.0	7.0	0.28	0.32	8.30	0.97	0.53
SC	3	120.0	4.0	-	0.24	0.27	-	0.60
SC	6	120.0	4.0	0.14	0.32	2.30	0.71	0.51
SC	9	120.0	4.0	-	0.30	0.32	0.75	0.52
SD	3	120.0	7.0	-	-	5.40	-	0.50

SD	6	120.0	7.0	-	0.26	11.90	0.65	0.57
SD	9	120.0	7.0	0.20	0.35	13.60	0.93	-
SE	3	47.57	5.5	-	0.22	0.40	-	0.50
SE	6	47.57	5.5	-	0.21	1.50	0.70	0.54
SE	9	47.57	5.5	0.17	0.28	0.39	0.76	0.52
SF	3	132.4	5.5	-	0.28	0.27	-	0.50
SF	6	132.4	5.5	-	0.32	0.94	0.70	0.54
SF	9	132.4	5.5	-	0.28	2.70	0.71	0.53
SG	3	90.0	3.37	-	0.23	0.20	-	0.50
SG	6	90.0	3.37	-	0.27	0.28	0.66	0.54
SG	9	90.0	3.37	0.16	0.29	0.25	0.82	0.51
SH	3	90.0	7.62	-	-	6.00	-	0.54
SH	6	90.0	7.62	-	0.28	11.00	0.74	0.53
SH	9	90.0	7.62	0.21	0.49	12.00	0.96	0.52
SI	3	90.0	5.5	-	0.23	0.26	-	0.56
SI	6	90.0	5.5	-	0.34	1.39	0.65	0.56
SI	9	90.0	5.5	0.15	0.59	0.76	0.84	0.54
SJ	3	90.0	5.5	0.27	-	0.40	0.63	0.63
SJ	6	90.0	5.5	0.14	0.28	0.31	0.68	-
SJ	9	90.0	5.5	0.15	0.33	0.69	0.74	0.54
SL	3	90.0	5.5	-	0.23	0.37	0.95	-
SL	6	90.0	5.5	-	0.30	1.30	0.79	0.57
SL	9	90.0	5.5	0.19	0.40	1.14	0.71	0.51

West (2011) utilized *A. niger* and *Aspergillus flavus* as producers of malic acid by converting vinasse composed of glucose, glycerol and lactic acid. This author obtained a production of 17 g . L⁻¹ of malic acid by *A. niger* ATCC9142 after 192 hours of cultivation. The production described in the present work by *A. tubingensis* AN1257 was 13.6 g . L⁻¹ after 216 h (9 days). This production encourages further studies for a variety of reasons. First, this

strain is not well studied yet, and showed ability to accumulate malic acid even without genetic engineering. Second, sucrose concentration may be further adjusted to increase production, and finally, it is important to establish a biotechnological route for ecological sustainability, whereas malic acid is still obtained from petroleum. Adjustment of the biotechnological process for malic acid production can pave the pathway for its obtention in larger scales at a reduced cost, once the media and conditions applied in the present work were simple and utilized cheap and common substrates.

Statistical analysis of pH and sucrose effects on malic acid production by *A. tubingensis* AN1257

Results of bioprocesses planned by CCD were analyzed with the software Statistics, in order to determine the significance of the effects of pH and sucrose concentration on malic acid production by strain AN1257. The analysis did not reveal a significant effect of sucrose concentration on product accumulation in the present study (Figure 6). Pareto graphs in Figure 6 show that sucrose effect on malic acid production was not significant at each time of cultivation (3, 6, and 9 days). Thus, while increasing sucrose concentration coincides with increases in malic acid production, this effect was not statistically significant, meaning that the variation from 60-120 g. L⁻¹ did not cause significant differences in malic acid accumulation. In other words, similar production can be reached with lower concentrations.

Production of malic acid was significantly influenced by culture pH, which presented both linear and quadratic positive effects. The linear effects of pH were 9.44; 3.70; and 9.25 for the production of malic acid after 3, 6, and 9 days, respectively (Figure 6). This positive effects confirms statistically that higher pH is better for malic acid accumulation by *A. tubingensis* AN1257. As shown in Figure 6, the positive quadratic effect of pH (5.4) on malic acid accumulation after 9 days - the best time for production studied in the present work - was also positive. The statistics of experiments show correspondence to the normal probability.

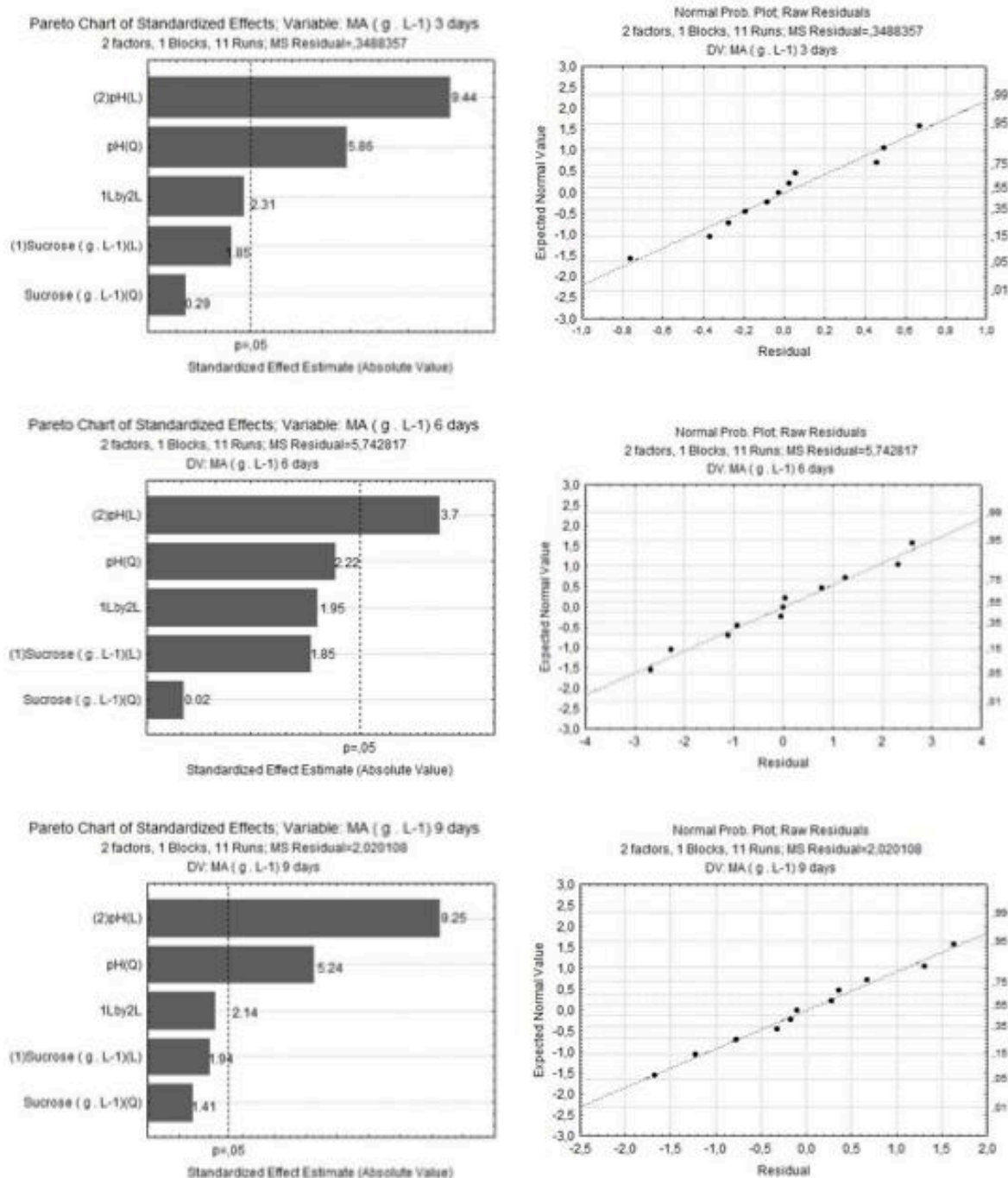


Figura 6: Effect of independent variables pH and sucrose concentration on malic acid production by *A. tubingensis* AN1257. Pareto Graphs show the intensity of the linear and quadratic effects of pH and sucrose on the concentration of malic acid after 3 (Graph A), 6 (Graph C), and 9 days (Graph E). Graphs B, D, and F show the normal probability plots for each analysis.

The possible pathways for 4 of the acids determined in the supernatants of cultures of *A. tubingensis* AN1257 - citric, succinic, malic, and lactic acids - are summarized in Figure 7, except for tartaric acid, whose pathway of accumulation in fungi remains unclear.

The metabolic pathway for citric acid production by *A. niger* is well established. It is obtained from the pyruvate produced in carbohydrate catabolism, in an excess of glucose or other fast assimilating saccharide. For citric acid production, a combination of factors is

After oxidation through glycolysis, 1 mol glucose is converted to 2 mols pyruvate, which are further converted to 1 mol oxaloacetate - by catalysis of the cytosolic pyruvate carboxylase - and 1 mol of acetyl-CoA - by catalysis of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. Before condensation of oxaloacetate and acetyl-coA in the TCA cycle to form citrate, the precursor oxaloacetate is reduced to malate in the cytosol, and further oxidized again inside mitochondrion (Figure 7). To sustain citric acid accumulation, oxaloacetate acetyl hydrolase (OAH) - which converts oxaloacetate to oxalate, a frequent byproduct of citric acid production - must be inhibited. This can be achieved by decreasing pH and limiting metal ions in media, once OAH is active at pH 5-6 and requires Mn^{2+} , as reviewed by Plassard & Fransson (2009).

Accumulation of succinic acid is less comprehended. However, as it is, like citrate, an intermediary of the TCA cycle, conversion of glucose to pyruvate, and then to oxaloacetate as precursor, may be important (Figure 7). Formation of oxaloacetate occurs in the cytosol by carboxylation of pyruvate and, after reduction to malate, ensures entry in mitochondrion and supply of TCA. As the reactions are reversible, malate could be converted to fumarate, and succinate, or just be converted to citrate to follow the normal flux of the cycle until succinate. Formation in the glyoxylate cycle could also be possible, requiring investigation. Entry of malate into the glyoxysome with further conversion to citrate, then to succinate, is plausible, once its an alternative pathway for oxidation of acetyl-CoA.

Another intermediary in both TCA and glyoxilate cycles, malic acid is instead formed from oxaloacetate in the cytosol, in the reductive TCA cycle (rTCA) as shown in Figure 7. Brown *et al.* (2013) over expressed the native pyruvate carboxylase and malate dehydrogenase-encoding genes in *Aspergillus oryzae*, what largely increased malic acid production. This confirms the cytosolic rTCA as the pathway for malate obtention in *Aspergillus*, whereas investigation in *A. tubingensis* has not been done yet. For malate accumulation, pH near neutrality is necessary, on the opposite of the acidic condition which allows citric acid production. The question is why pH near 6 or 7 is better, once high activation of OAH could deplete oxaloacetate to form oxalate. Indeed, manipulation of *A. niger* to contain several copies of an OAH-encoding gene increased oxalic acid production, while deletion of this gene plus insertion of the genes encoding pyruvate carboxylase and malate dehydrogenase resulted in a strain overproducing malic acid (Xu *et al.*, 2019). Malate dehydrogenase also functions in pH near neutrality. Thus, a challenge is to selectively inactivate OAH, not malate dehydrogenase.

The map 00630 of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), built on basis of a variety of published work and investigations on biochemistry of several organisms, shows the pathway for tartaric acid production is in glyoxylate and dicarboxylate metabolism (KEGG, https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00630). It can be formed from oxaloacetate originated from pyruvate metabolism, in a reversible reaction catalyzed by tartrate dehydrogenase. It could also be formed from oxaloglycolate, yet by catalysis of a tartrate dehydrogenase, or from meso-tartrate, which are both linked to ascorbate metabolism. The ascorbate route is important for production of tartrate in higher plants, including grapes, where tartaric acid contributes to the acidic component and confers microbiological stability. It is formed in *Vitis vinifera* from the catabolism of acid ascorbic to L-idonate, which is then converted to D-gluconate, and finally to tartrate (Cholet *et al.*, 2016). Reports of the routes operating in fungi are scarce, thus, we searched fungal genomes for genes coding enzymes for tartaric acid production: tartrate dehydratase - playing a role in the formation from oxaloacetate - and tartrate epimerase - playing a role in the interconversion of the two isomers.

Following the KEGG orthology for the enzyme tartrate dehydratase alpha subunit (Enzyme Commission Number, EC 4.3.1.32, KEGG K03779) we found several entries for bacterial enzymes with the same EC number at the Uniprot page (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A087FW24>). Searching the protein database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) allowed to retrieve 2 fungal proteins, both from *Beauveria bassiana*. Running BLASTp with the sequence of entry KGQ11123.1, allowed to recover 113 fungal sequences, being 61 from Ascomycota, and 8 from the genus *Aspergillus*. The 8 sequences from *Aspergillus* were related to the two component sensing system histidine kinase, but none concerned to tartaric acid synthesis, showing more studies are needed to elucidate this pathway in fungi. A search for tartrate epimerase (EC 5.1.2.5) at the GenBank (NCBI) retrieved 18 proteins, 4 of which were of bacterial tartrate epimerases. BLASTp of the tartrate hydratase from *Bradyrhizobium japonicum* (PDB 2DW6_D) against the fungal sequences found 189 hits. Among the hundred most significant alignments, none of the proteins retrieved had activity of tartrate epimerase specifically described, whereas most were other enolases, racemases or hydratases, without reaching 30% of identity. All these analyses show that, although AN1257 accumulates tartaric acid in small amounts, the fungal route for its formation requires another study.

CONCLUSION

As organic acids are produced by microbial strains, the challenge is to develop a bioprocess by studying physiology and biochemistry. In a trial for organic acid producers, *A. tubingensis* AN1257 showed to have potential for acid secretion either when cultivated at pH 4 or 6, when compared to a standard acid producing strain of *A. niger*. Analysis of *A. tubingensis* AN1257 cultures showed its potential to convert sucrose to malic acid. Even without any molecular modification, this strain accumulates acid malic when cultivated in high sucrose concentration (12%) and at pH 7, in very simple media, requiring only phosphate and inorganic nitrogen sources in moderate amounts to produce 13.6 L⁻¹. These results show this species is promising as a producer of malic acid, what paves the way for further improvements. Besides, as a gama of organic acids were also produced, results suggest *A. tubingensis* as a potential model to investigate organic acid production, especially those whose mechanism of accumulation still requires further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the research conducted by S.V.B.C.B in partial fullfillment of the requirements for the doctor degree, under the Program of Post-graduation in Biofuels of UFVJM.

REFERENCES

- ABE, S. *et al.* Method of producing Lmalic acid by fermentation. **US Patent** 3:063, 910, 1962.
- ANDERSEN, M. R. Elucidation of primary metabolic pathways in *Aspergillus* species: orphaned research in characterizing orphan genes. **Brief Funct Genomics** 13(6):451–455, 2014.
- BATTAT, E. *et al.* Optimization of L-malic acid production by *Aspergillusflavus* in a stirred fermenter. **Biotechnol Bioeng.**, v. 37, p. 1108–1116, 1991.
- BROWN, S. H. *et al.* Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 8903–8912, 2013.
- CASTELANI, A. The water cultivation of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 283-284, 1963.
- CHOLET, C. *et al.* Tartaric acid pathways in *Vitis vinifera* L. (cv. Ugni blanc): a comparative study of two vintages with contrasted climatic conditions. **BMC Plant Biology**, v. 16, p. 144, 2016.

CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Available in < www.ncbi.nlm.nih.gov >. Access in: 5/11/2019.

DEZAM, A. P. G. *et al.* Microbial production of organic acids by endophytic fungi A.P.G. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282-287, 2017.

HARRIS, D. C., *Análise Química Quantitativa*, 6ª Edição, LTC-Livros Técnicos e Científicos. Editora: S.A., Rio de Janeiro-RJ, 2005.

KALLITHRAKA, S.; BAKKER, J.; CLIFFORD, M. N. Red Wine and Model Wine Astringency as Affected by Malic and Lactic Acid. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 416-420, 1997.

KEGG. Available in <https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00630>. Access in: 5/11/2019.

MAX, B. *et al.* Biotechnological production of citric acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 862-875, 2010.

OCHSENREITHER, K. *et al.* Process characterization and influence of alternative carbon sources and carbon-to-nitrogen ratio on organic acid production by *Aspergillus oryzae* DSM1863. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 5449–5460, 2014.

PAPADAKI, E.; MANTZOURIDOU, F. T. Citric acid production from the integration of Spanish-style green olive processing wastewaters with white grape pomace by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 59-69, 2019.

PLASSARD, C.; FRANSSON, P. Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi. **Fungal biology reviews**, v. 23, p. 30 – 39, 2009.

SANTOS, R. S. *et al.* Avaliação de coprodutos sólidos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono para produção de enzimas holocelulolíticas sintetizadas por *Aspergillus tubingensis* AN1257. **Sodebras**, v. 10, n. 112, 2015.

UNIPROT PAGE. Available in < <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A087FW24>>. Access in: 5/11/2019.

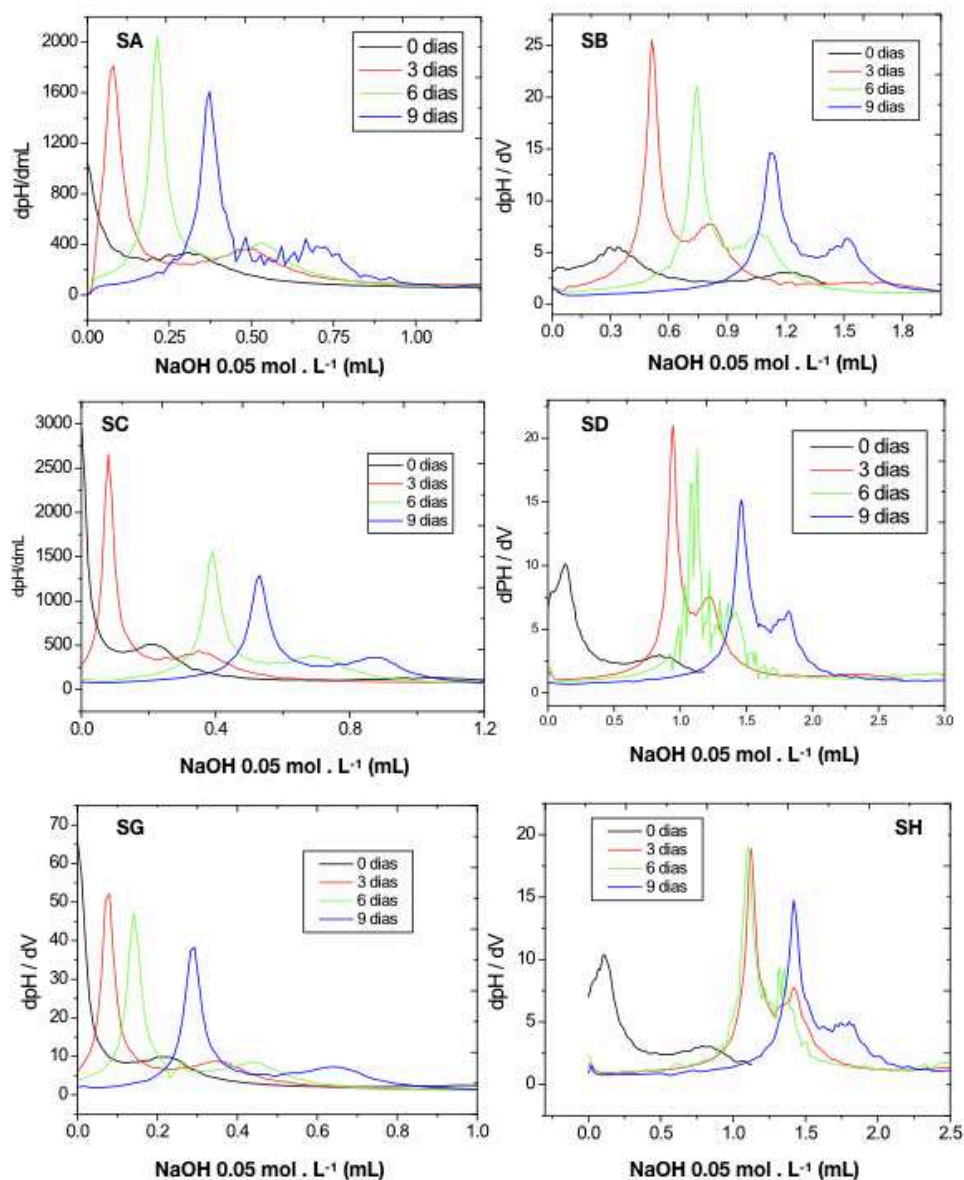
WERPY, T.; PETERSEN, G. Top value added chemicals from biomass: I. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. **US Department of Energy, Washington**, 2004.

WEST, T. P. Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species. **Biotechnol Lett**, v. 33, p. 2463–2467, 2011.

WU, B. *et al.* Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127-140, 2019.

XU, Y. *et al.* Development of a Cre-loxP-based genetic system in *Aspergillus niger* ATCC1015 and its application to construction of efficient organic acid-producing cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8105–8114, 2019.

Supplementary material:



Potentiometric titration and derivate of organic acid production in submerged processes. The derivate method was applied after potentiometric titration to estimate the total acid concentration produced by *Aspergillus tubingensis* AN1257 in submerged processes supplemented with sucrose at 60 (SA, SB), 90 (SC, SD), or 120 g . L⁻¹ (SG, SH) and at pH 4.0 (SA, SC), 7.0 (SB, SD), 3.37 (SG) or 7.62 (SH).

8.1.2 Artigo II

THE GENUS *FUSARIUM* AS SOURCE OF THE ANTI-LEUKEMIC ENZYME L-
ASPARAGINASE: ADJUSTMENT OF THE PRODUCTIVE CONDITIONS.

International Journal of Development Research, v. 09, p. 29843-29848, 2019.

COELHO, S. V. B.; VANZELA, A.P.F.C.

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina – MG, Brasil.



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 09, Issue, 09, pp. 29843-29848, September, 2019

REVIEW ARTICLE

OPEN ACCESS

THE GENUS *FUSARIUM* AS SOURCE OF THE ANTI-LEUKEMIC ENZYME L-ASPARAGINASE: ADJUSTMENT OF THE PRODUCTIVE CONDITIONS

*Suedali Villas Bôas Coelho and Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela

Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys – Diamantina MG - Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 20th June, 2019

Received in revised form

13th July, 2019Accepted 17th August, 2019Published online 30th September, 2019

Key Words:

L-asparaginase; Filamentous fungi,
Anti-leukemic, Factorial planning.

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase is used to avoid acrylamide formation in food, and as a pharmaceutical to treat Acute Lymphoblastic Leukemia. As fungi are eukaryote and good enzyme producers, it is desirable to obtain a fungal L-asparaginase as an alternative to the bacterial enzymes that are currently used in the clinical practice. Glycerol use as carbon source for the metabolism of filamentous fungi is of great interest, once it can be used as a cheaper substrate for enzyme production, L-asparaginase alike, avoiding its discard in nature. As objective of this work, we verified the potential of a strain of *Fusarium* sp. to convert glycerol to L-asparaginase. Statistical planning of bioprocesses was used to determine significant variables that could be applied for the improvement of the production. The concentrations of glycerol, L-asparagine, and the pH presented significant positive effects. By combining data from multivariate analysis, it was possible to greatly increase enzyme production. The high enzyme activity obtained (29.08 IU) is promising and opens a perspective of evaluating its anticarcinogenic activity in different tumor cell lines and, thus, to acquire a better comprehension of the L-asparaginase produced by filamentous fungi.

Copyright © 2019, Suedali Villas Bôas Coelho and Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Suedali Villas Bôas Coelho and Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela. 2019. "The genus *Fusarium* as source of the anti-leukemic enzyme L-asparaginase: adjustment of the productive conditions". *International Journal of Development Research*, 09, (09), 29843-29848.

INTRODUCTION

L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, E.C. 3.5.1.1) catalyzes the irreversible conversion of L-asparagine in L-aspartate and ammonia in aqueous environment (Shanthipriya *et al.*, 2015). It has become prominent by its various and important applications, like in the food industry where it is used to reduce the levels of the carcinogenic compound acrylamide when food is processed at high temperatures (Cachumba *et al.*, 2016). In the pharmaceutical industry, it is one of the main therapeutic enzymes from microbial origin used to treat proliferative disorders of the lymphoid system, mainly acute lymphoblastic leukemia (ALL), Hodgkin's lymphoma, and other lymphoid malignancies (Einsfeldt *et al.*, 2016). According to Grigoropoulos *et al.* (2013), ALL is the most frequent cancer in children, and its global incidence is about 3 per 100.000 inhabitants, mostly affecting children under 6 years of age. Thus, L-asparaginase has been fundamental in chemotherapy protocols since more than four decades ago (Zuo *et al.*, 2015).

While normal cells can synthesize L-asparagine, tumor cells require this amino acid in abundance to guarantee rapid growth (Luhana *et al.*, 2013). Thus, L-asparaginase is selective for leukemic cells, once, when administered intravenously, it hydrolyzes L-asparagine in the blood and affects only the viability of the cancer cells (Ali *et al.*, 2016). This enzyme is classified by the World Health Organization as one of the most important medicines for the basic health system (Shanthipriya *et al.*, 2015). Animals and plants can produce L-asparaginase, but microorganisms are its main source (Deshpande *et al.*, 2014). Several bacteria are able to produce the enzyme: *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Proteus vulgaris*, *Streptomyces karnatakensis*, *Streptomyces venezuelae*, (Cachumba *et al.*, 2016). The commercial formulations currently used are produced by *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora* or *Erwinia chrysanthemi*. However, these can cause hypersensitivity and toxicity (Mahajan *et al.*, 2013). Other producers like filamentous fungi and yeasts have been progressively studied in depth (Loureiro *et al.*, 2012). Hosamani and Kaliwal (2011) observed that eukaryote microorganisms, including yeasts and filamentous fungi from the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, produce L-

*Corresponding author: Suedali Villas Bôas Coelho,
Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys –
Diamantina MG - Brazil

asparaginase with less adverse effects. In fact, a fungal L-asparaginase decreased viability of leukemic cells without toxicity for normal cells *in vitro* (Loureiro *et al.*, 2012). The large production of biodiesel in the last years brought glycerol as main byproduct, in such a way that to avoid problems with its discard, it is increasingly needed to search alternative applications (Rivaldi *et al.*, 2008). Filamentous fungi like *Fusarium* sp. T22.2, a strain selected in previous studies, are able to convert glycerol to value-added products like L-asparaginase, contributing to decrease the costs of production and helping to solve the problem of glycerol discard in nature (Gonçalves *et al.*, 2016). Several factors are important for the industrial production of L-asparaginase, either to increase yield or to improve the economic viability. The carbon and nitrogen sources, their concentrations, pH, aeration, temperature, time of fermentation, and especially the microbial agent strongly influence the productive process (Baskar and Sahadevan, 2012). The most used carbon sources are glucose, starch, and maltose, which can be replaced by glycerol for microorganisms that can do the bioconversion (Cachumba *et al.*, 2016). Solid state fermentation is used to produce L-asparaginase, but submerged fermentation remains the main productive process (Lopes *et al.*, 2015). As a main point for the production, the search for new strains needs to be taken into account, seeking for enzymes with better therapeutic properties and less toxic effects (Dutta *et al.*, 2015). Thus, the objective of this work was to verify the potential of a strain of *Fusarium* sp. to convert glycerol to L-asparaginase.

MATERIAL AND METHODS

Strain maintenance: *Fusarium* sp. T22.2 was cultivated weekly in Czapek-Dox agar (Frisvad and Samson, 2004) at 30 °C to collect spores for inoculums. For strain maintenance, small blocs of agar covered by mycelium were submerged in sterile distilled water contained in 2 mL micro tubes, and stored under refrigeration (4 ± 1 °C). Stocks were replaced at every 6 months.

Factorial planning (multivariate analysis): Experimental conditions for productive bioprocesses were generated with *Statistica* 7.0. (StatSoft Inc.) The concentration of glycerol (carbon source), L-asparagine (nitrogen source), and the pH were used as independent variables in a 2^n full factorial planning, where n is the number of variables studied, yielding 8 different runs. A fractional factorial planning 2^{n-1} or 2^{n-2} would be applied instead of a full planning if the number of independent variables to be analyzed were too large, making the experimental runs excessively numerous. However, as three variables were investigated in the present study, a full factorial planning with 8 runs was preferable. The minimal and maximal levels of each variable were: 0.5 and 20 g L⁻¹ for glycerol; 0.5 and 10 g L⁻¹ for L-asparagine; 5.5 and 6.5 for pH. Production of L-asparaginase activity was investigated at 24 h intervals from 48 to 120 h. Statistical analysis was performed to identify the best level of each variable and its interactions in order to apply for process improvement. All reagents for medium preparation and enzyme determination were of analytical grade.

L-asparaginase production by liquid state fermentation: The bioprocesses were conducted by liquid state stationary fermentation in 60 mL of media contained in 125 mL Erlenmeyer flasks. Besides glycerol, L-asparagine and pH adjusted as determined by factorial planning, media contained:

2 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0.5 g L⁻¹ NaCl; 0.2 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O. Spores from strain T22.2 suspended in distilled water were inoculated to a final concentration of 10⁵ per mL of media. Cultures in triplicate were incubated for 120 h at 30 °C. Samples were removed at 24 h intervals from 48 h of incubation, and centrifuged for 10 minutes at 3.000 g. Enzyme activity was determined in the supernatant.

Improvement of L-asparaginase production: After factorial planning and statistical analysis, other bioprocesses were elaborated by combining different concentrations of glycerol and L-asparagine, and by adjusting the pH according to the effects determined for each variable and their interactions. Three new media were elaborated and contained: A) 25 g L⁻¹ glycerol; 5 g L⁻¹ L-asparagine; pH 8; B) 29,7 g L⁻¹ glycerol; 10 g L⁻¹ L-asparagine; pH 7; C) 5 g L⁻¹ glycerol; 15 g L⁻¹ L-asparagine; pH 6. Other medium constituents (KH₂PO₄; NaCl; MgSO₄ 7H₂O) did not vary. Bioprocesses were inoculated and conducted by liquid state stationary fermentation as described above. Cultures were incubated for 120 h at 30 °C, and samples were removed daily from 72 h for determination of L-asparaginase activity.

Determination of L-asparaginase activity: L-asparaginase was determined as adapted from Chow and Ting (2015). The reaction mixture was prepared in 1.5 mL polypropylene tubes by mixing 0.1 mL of Tris. HCl 1 mol L⁻¹ pH 7 with 0.2 mL of L-asparagine 8 mmol L⁻¹ and 0.1 mL of distilled water. After pre-incubation at 37 °C, 0.1 mL of the supernatant containing the enzyme was added, and the reaction was incubated for 37

°C for 30 minutes. Enzyme reaction was stopped with 0.1 mL of trichloroacetic acid (TCA) 1.5 mol L⁻¹. Control samples were prepared by addition of TCA before the enzyme, and considered to be the time zero of reaction. An aliquot of 0.1 mL was collected from the reaction and added to 0.45 mL of Nessler reagent plus 0.6 mL of distilled water to determine the amount of ammonia formed by L-asparagine hydrolysis. After incubating at 28 °C for 15 minutes, absorbance was determined at 450 nm against a blank prepared as the reaction, except for replacing the supernatant by distilled water. The concentration of ammonia liberated in the reaction was calculated against a calibration curve, considering the difference among the final (30 minutes of reaction) and the initial (time zero) absorbance. L-asparaginase activity was determined in international units (IU); whereas one unit is the amount of enzyme which forms 1 μmol min⁻¹ mL⁻¹ of ammonia in the reaction conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Factorial planning (multivariate analysis) and L-asparaginase production: Filamentous fungi are able to produce L-asparaginase, a therapeutic enzyme used to treat diseases like ALL and other disorders of the lymphoid system. Thus, after studies of Gonçalves *et al.* (2016), which verified that *Fusarium* sp. T22.2 produced this enzyme with an activity that liberated 11.4 μg min⁻¹ mL⁻¹ of ammonia in the reaction (equivalent to approximately 0.7 IU), we decided to improve the productive process. Due to the augment of biofuel production in Brazil, including biodiesel, there has been a large production of biodiesel-derived glycerol, which corresponds to 10% of the production (Papanikolaou and Aggelis, 2002). There is an excess of glycerol being produced, what demands search for viable applications as a way to avoid its discard in nature. Unlike most of the reported studies, in the present work, we used glycerol as carbon source for the

production of L-asparaginase by *Fusarium* sp. T22.2. By applying factorial planning we were able to generate 8 different bioprocesses combining the maximal and minimal values of the independent variables analyzed (glycerol and L-asparagine concentrations and pH) in a multivariate analysis. The main purpose of this approach is to avoid the excessive number of steps usually taken to improve a productive process when univariate analysis is used. Besides, analysis of each variable at once, while others are fixed until the best value of each parameter is achieved, presents as disadvantage the impossibility to determine the interactions among variables, what could be done with the approach we used herein. Determination of L-asparaginase in the supernatant of cultures showed that after 48 h almost no activity is produced by *Fusarium* sp. T22.2. For this reason, results of L-asparaginase production in the planned bioprocesses are shown from 72 h, when the enzymatic activity starts to increase (Table 1). The maximal activity was obtained after 96 h, in bioprocess 8 and reached 27.33 IU as shown in Table 1. This process – supplemented with glycerol at 20 g L⁻¹; L-asparagine at 10 g L⁻¹; and adjusted to pH 6.5 – was the best condition for the enzyme production, and allowed to obtain a high activity even after 72 h (10.34 IU). Other bioprocesses also yielded good activities, although at higher times of incubation.

Bioprocesses 3 and 4 induced the production of 8.18 IU and 14.59 IU of L-asparaginase after 120 h of cultivation (Table 1). Statistical analysis of data allowed determination of the effects of the independent variables (glycerol, L-asparagine, and pH) and their interactions. Effects are shown by means of Pareto graphs for the response L-asparaginase activity after 72 h (Graph 1) and 96 h (Graph 2). Analysis of variance is shown in Table 2. For significance determination, p-value threshold was equal to 0.05. Effects were statistically significant, as shown by p-values < 0.05 (Table 2), whereas interaction among variables 1 and 3 (glycerol by pH) in the cultures of 120 h was not significant (p = 0.08). In Pareto graphs, significance of effects is shown by the p-value threshold dotted line, set to 0.05. Significant effects extend beyond this line to the right, while non-significant ones remain at left (Graphs 1-3). L-asparaginase production after 72 h of cultivation was strongly and positively influenced by the concentration of L-asparagine, which showed the highest effect among the variables analyzed (6.47), followed by glycerol concentration (4.63) and pH (2.82). Such positive effects indicate that the highest level of each variable should be applied to improve enzyme production, i.e. L-asparagine at 10 g L⁻¹ should be applied instead of 0.5 g L⁻¹. Similarly, glycerol supplementation at 20 g L⁻¹ may yield a better enzyme production than 0.5 g L⁻¹.

Table 1. Production of L-asparaginase by *Fusarium* sp. T22.2 in bioprocesses designed by factorial planning. Processes were designed by the combination of the minimum and maximal levels of glycerol, L-asparagine, and pH. Enzyme activity was determined in the supernatant, and is shown as mean ± standard deviation of three replicates. One unit was defined as the amount of enzyme which catalyzes the formation of 1 µmol of ammonia per mL per minute of reaction at 37 °C and pH 7. IU international units

Bioprocess	Glycerol (g L ⁻¹)	Asparagine (g L ⁻¹)	pH	L-asparaginase Activity (IU)		
				72 h	96 h	120 h
1	0.50	0.50	5.50	1.32±0.82	1.49±0.13	1.49±0.22
2	20.00	0.50	5.50	0.75±0.07	1.56±0.08	0.55±0.15
3	0.50	10.00	5.50	2.90±0.08	2.60±0.33	8.18±1.01
4	20.00	10.00	5.50	3.19±0.27	4.65±0.88	14.59±1.06
5	0.50	0.50	6.50	0.81±0.02	0.73±0.06	0.37±0.23
6	20.00	0.50	6.50	1.80±0.61	0.94±0.11	1.08±0.11
7	0.50	10.00	6.50	1.25±0.40	1.79±0.62	3.17±0.05
8	20.00	10.00	6.50	10.34±1.22	27.33±1.71	3.87±1.08

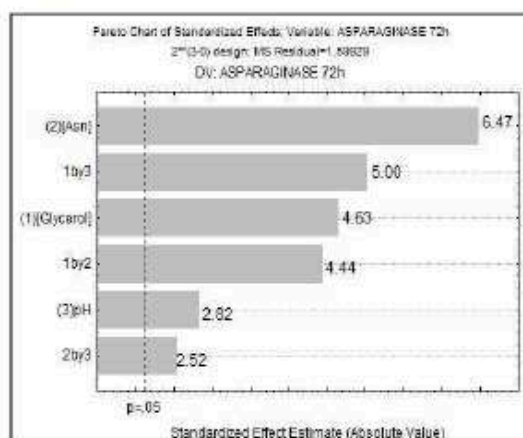
Table 2. Analysis of Variance (ANOVA) on data obtained from bioprocess designed by factorial planning for L-asparaginase production

Variable: L-asparaginase (72 h); R-square 0.87806					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) [Glycerol]	34.2918	1	34.29177	21.44186	0.000239
(2) [Asn]	67.0254	1	67.02544	41.90949	0.000006
(3) pH	12.7219	1	12.72195	7.95475	0.011788
1by2	31.5199	1	31.51991	19.70869	0.000359
1by3	40.0226	1	40.02261	25.02523	0.000109
2by3	10.1965	1	10.19646	6.37561	0.021802
Error	27.1879	17	1.59929		
Total SS	222.9661	23			
Variable: L-asparaginase (96 h); R-square 0.87811					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) [Glycerol]	292.473	1	292.4734	23.55472	0.000149
(2) [Asn]	374.188	1	374.1880	30.13571	0.000040
(3) pH	159.211	1	159.2106	12.82223	0.002303
1by2	282.744	1	282.7436	22.77112	0.000177
1by3	207.886	1	207.8864	16.74239	0.000760
2by3	204.124	1	204.1236	16.43936	0.000824
Error	211.085	17	12.4168		
Total SS	1731.711	23			
Variable: L-asparaginase (120 h); R-square 0.94545					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) [Glycerol]	17.1813	1	17.1813	10.3217	0.005106
(2) [Asn]	260.8980	1	260.8980	156.7345	0.000000
(3) pH	100.8539	1	100.8539	60.5880	0.000001
1by2	20.8036	1	20.8036	12.4977	0.002542
1by3	5.5574	1	5.5574	3.3386	0.085280
2by3	85.1956	1	85.1956	51.1813	0.000002
Error	28.2980	17	1.6646		
Total SS	518.7878	23			

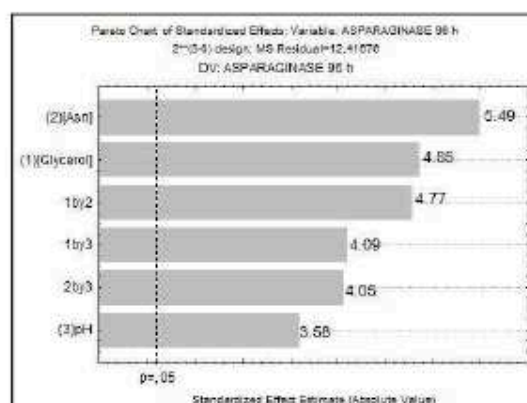
Data also showed that pH near the neutrality is better than an acidic value for enzyme production after 72 h. However, among these variables, the most important was L-asparagine concentration. Yet, some variable interactions were more important than the effect of the variable alone. For instance, interaction 1 by 3 (glycerol concentration and pH) presented an effect of 5 on enzyme production, higher than the isolated effects of glycerol and pH. The positive value for interaction 1 by 3 means that at higher concentrations of glycerol, a higher value of pH must be applied to improve L-asparaginase production after 72 h (Graph 1). As interactions 1 by 2 (glycerol concentration and L-asparagine concentration) and 2 by 3 (L-asparagine concentration and pH) also presented positive effects for enzyme production, the adjustment of the production was facilitated, because these demand that increases in one variable level be followed by increases in the others, obeying the individual effects which indicated that the highest level of each variable should be applied (Graph 1).

A highly significant positive effect of L-asparagine concentration on L-asparaginase production by *Fusarium* sp. T22.2 after 96 h of cultivation was also determined (Graph 2). This effect (5.49) was similar to the effect determined for this variable on enzyme production after 72 h (6.47). However, after 120 h of cultivation, the concentration of L-asparagine had its higher effect (12.52) on enzyme production (Graph 3), indicating that for longer times of cultivation, the concentration of this nitrogen source, which might possibly act as inducer of the gene coding for L-asparaginase, should be higher when the process is started because it is progressively depleted in the medium. Glycerol effects on enzyme production were also similar after 72 h (4.63) and 96 h (4.85), as shown in Graphs 1 and 2. However, glycerol effect decreased after 120 h of cultivation (3.21) as shown in Graph 3, indicating that it performed a role different of L-asparagine for the productive process. The role of glycerol, as carbon source, might have been to sustain growth of the strain, what

could be more important at the initial times of cultivation than at the final times, when the producing biomass may have already been formed.

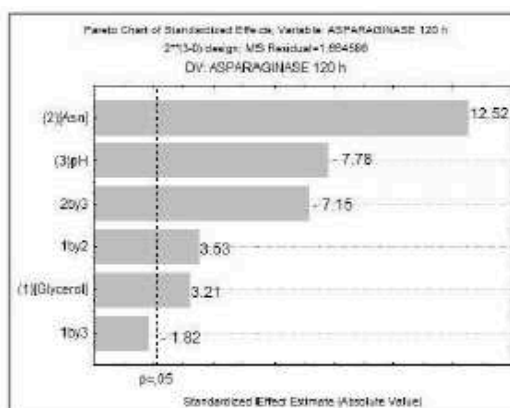


Graph 1. Pareto graph showing value and statistical significance of the effects of [Asn] (L-asparagine concentration); [Glycerol] (glycerol concentration), pH, and interactions among these independent variables for L-asparaginase production by *Fusarium* sp. T22.2 after 72 h of cultivation. Interactions: 1 by 3, glycerol by pH; 1 by 2, glycerol by L-asparagine; 2 by 3, L-asparagine by pH



Graph 2. Pareto graph showing value and statistical significance of the effects of [Asn] (L-asparagine concentration); [Glycerol] (glycerol concentration), pH, and interactions among these independent variables for L-asparaginase production by *Fusarium* sp. T22.2 after 96 h of cultivation. Interactions: 1 by 3, glycerol by pH; 1 by 2, glycerol by L-asparagine; 2 by 3, L-asparagine by pH

The most striking change in the variable behavior for the enzyme production was that of pH, which turned to be negative after 120 h of cultivation, as well as of its interaction with L-asparagine concentration 2 by 3 (Graph 3). This indicates that for longer periods of cultivation, the adjustment of the initial pH of media at the lower level evaluated (pH = 5.5) is better for enzyme production. Analyzing in function of the cultivation time, it means that the higher level of pH (pH = 6.5) – or pH near the neutrality – tends to induce a more rapid production than the lower value, anticipating the maxima of enzyme activity.



Graph 3. Pareto graph showing value and statistical significance of the effects of [Asn] (L-asparagine concentration); [Glycerol] (glycerol concentration), pH, and interactions among these independent variables for L-asparaginase production by *Fusarium* sp. T22.2 after 120 h of cultivation. Interactions: 1 by 3, glycerol by pH; 1 by 2, glycerol by L-asparagine; 2 by 3, L-asparagine by pH

Considering the effects determined for the variables and their interactions, as well as the highest enzyme activity obtained after 96 h, it was concluded that values similar to highest level of each variable would be beneficial for the production. To test

this hypothesis, three conditions were used for production, whose results are shown in Figure 1.

Improvement of L-asparaginase production: In the first condition developed for L-asparaginase production, bioprocess A, The values for glycerol and pH were above the highest level utilized in the planned bioprocesses, while L-asparagine was adjusted to an intermediary value. This condition induced production of 15.66 IU of L-asparaginase, but the time to obtain the maximal production in the culture was delayed to 120 h (Figure 1).

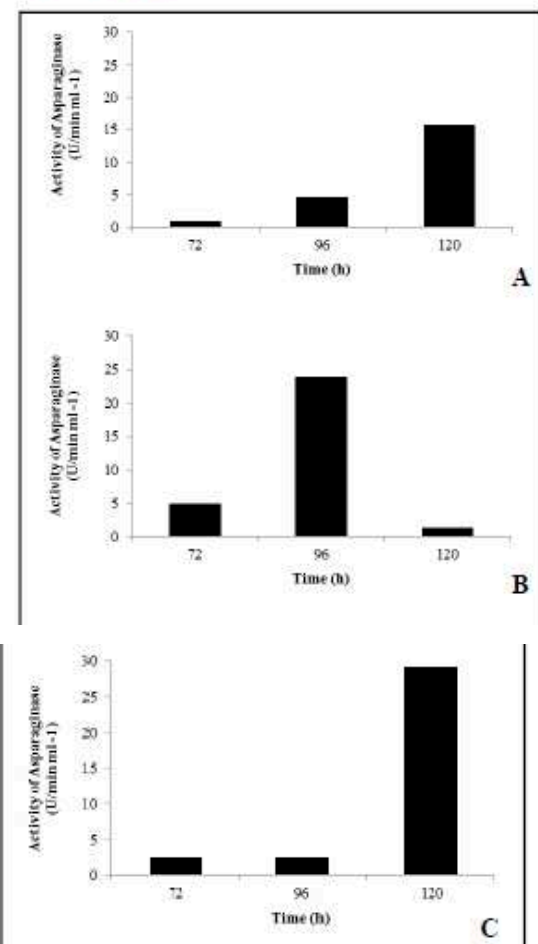


Figure 1. Production of L-asparaginase by liquid state fermentation. Cultures of *Fusarium* sp. T22.2 were prepared in three media designed as follows: Bioprocess A (25 g L⁻¹ glycerol; 5 g L⁻¹ L-asparagine; pH 8.0); Bioprocess B (29.7 g L⁻¹ glycerol; 10 g L⁻¹ L-asparagine; pH 7.0); Bioprocess C (5 g L⁻¹ glycerol; 15 g L⁻¹ L-asparagine; pH 6.0). Media were inoculated with 10⁵ conidia per mL, and incubated at 30 °C. Activity of L-asparaginase was determined in the supernatant of cultures, considering the µmoles of ammonia liberated in a thirty minute reaction at pH 7.0 and 37 °C. Enzyme activity was expressed in international units (IU).

Enzyme production at lower values of L-asparagine would be preferable because this substrate is expensive. Although production was delayed to 120 h, the enzyme activity produced in Bioprocess A was still high: 15.66 IU (Figure 1). Hosamani *et al.* (2011) evaluated different carbon sources for L-

asparaginase production by *Fusarium equiseti* in solid state fermentation: it was produced 3.26 U/mL and 0.21 U/mL in fermentations performed with soy flour and sugarcane bagasse. Deshpandes *et al.* (2014) utilized *Streptomyces ginsengisoli* to produce L-asparaginase by submerged fermentation in media supplemented with sucrose, glucose, lactose and manitol, and after optimization obtained 3.23 µmol/mL of L-asparaginase. Cultivation of *Fusarium* sp. T22.2 in the conditions of Bioprocess B (Figure 1) elevated production of L-asparaginase in comparison to that obtained in Bioprocess A. By adjusting the medium with glycerol at 29.7 g L⁻¹; L-asparagine at 10 g L⁻¹; and pH 7.0, it was possible to obtain 23.92 IU of L-asparaginase after 96 h. A shorter time of production is also preferable to longer ones. The enzyme activity produced in Bioprocess B was slightly lower than that produced in Bioprocess C (Table 1), perhaps due to the very high concentration of glycerol used (29.7 g L⁻¹). The best condition for L-asparaginase production by *Fusarium* sp. T22.2 was Bioprocess C, where the enzyme activity reached 29.08 IU after 120h. In this condition, pH was adjusted to 6.0, a value a little lower than the pH 6.5 indicated as preferable for L-asparaginase production by factorial planning. L-asparagine was adjusted to 15 g L⁻¹, a higher value than indicated by the statistical analysis (10 g L⁻¹) and glycerol was adjusted to 5 g L⁻¹, 10 times more than the minimum level applied in the planned bioprocesses (0.5 g L⁻¹) but 3 times less than the maximum level (20 g L⁻¹).

All the three bioprocesses A, B, C designed by considering statistical analysis and the effects determined for glycerol and L-asparagine concentration, pH, and the effects of the variable interactions (Graph 1, Graph 2), showed to be good conditions for L-asparaginase production by *Fusarium* sp. T22.2. By means of this approach, we got to elevate the production by approximately 40 times compared to that reported in the initial studies with strain T22.2 (Gonçalves *et al.*, 2016). Einsfeldt *et al.* (2016) produced recombinant L-asparaginase from

Zymomonas mobilis expressed in *E. coli*, reaching an extracellular activity of 0.13 U/mL. In a work where several bacterial isolates from soil were tested for L-asparaginase production, *Streptococcus* spp. D1 produced 11.6 U (Wakil and Adelegan, 2015). Vachhani and Desai (2018) also isolated several bacteria from soil and the best isolated produced 18.66 U of L-asparaginase after 96 h of cultivation in tryptone glucose yeast extract with 1% L-asparagine. In another work, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JHS-71 produced 240 U (Badoei-Dalfard, 2016). These studies show several bacterial isolates producing L-asparaginase, but, once the bacterial enzymes employed in commercial formulations are usually implicated in allergic responses, it would be suitable to investigate if the eukaryote enzymes, like those obtained from fungi, may present less adverse effects. To support investigation of fungal L-asparaginase concerning to its therapeutic or toxic properties, presence or absence of the secondary activity of L-glutaminase – as inherent of several bacterial forms of the enzyme – and for further studies of kinetics, it is important to increase production to suitable activities, like done in the present work.

Conclusion

The present work showed the suitability of a strain of *Fusarium* as eukaryote source of L-asparaginase. The maximum enzyme activity obtained – approximately 29 IU – was higher than reported in several works, and encourages

further studies for enzyme purification, kinetics determination, and evaluation of anti-leukemic properties. Besides, the enzyme activity was extracellular and could be maximized from 72 to 120 h, what characterizes a short time of production, comparable to that of bacterial bioprocesses. As an advantage, while several bioprocesses for L-asparaginase production requires, besides the enzyme inducer L-asparagine, carbon sources like glucose, sucrose, or others of higher cost, the strain *Fusarium* sp. T22.2 used in the present study produced L-asparaginase in media supplemented with glycerol, an alternative carbon source whose biotechnological exploitation is important from the ecological and economical perspectives.

Acknowledgements

This work is part of the research conducted by S.V.B.C.B. in partial fulfillment of the requirements for the doctor degree, under the Program of Post-graduation in Biofuels of UFVJM.

REFERENCES

- Ali, U. Naveed, M., Ullah, A., Ali, K., Shah, S. A., Fahad, S., Muntaz, A., S. 2016. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target *aLL*. *Eur J Pharmacol*. 771: 199-210.
- Badoei-Dalfard, A. 2016. L-asparaginase production in the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. *Mol. Biol. Res. Commun.* 5: 1-10.
- Baskar, G. and Sahadevan, R. 2012. Optimization of Culture conditions and Bench-Scale: Production of L-asparaginase by submerged Fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 923-929.
- Cachumba, J. J. M., Antunes, F. A. F., Peres, G. F. D., Brumano, L. P., Santos, J. C., Silva, S. S. 2016. Biotechnology and industry microbiology current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Braz. J. Microbiol.* 47: 77-85.
- Chow, Y. and Ting, A. S. Y. 2015. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *J. Adv. Res.* 6: 869-876.
- Desphande, M., Choubey, P., Agashe, M. 2014. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. *Scientific World Journal*. 2014: 895-167.
- Dutta, S., Ghosh, S., Pramanik, S. 2015. L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and Some Physicochemical Properties. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51: 425-431.
- Einsfeldt, K., Baptista, I. C., Castanheira, J. C., Pereira, V., Costa-Amaral, I. C., Costa, E. S., Almeida, R. V. 2016. Recombinant L-asparaginase from *Zymomonas mobilis*: A Potential New Antileukemic Agent Produced in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 11.
- Eisele, N., Linke, D., Bitzer, K., Na'ammieh, S., Nimtz, M., Berger, R. G. 2011. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresour. Technol.* 102: 3316-3321.
- Frisvad, J. C. and Samson, R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*. 49: 1-174.
- Gonçalves, A. B., Maia, A. N. F., Rueda, J. A., Vanzela, A. P. F. C. 2016. Fungal production of the anti-leukemic enzyme L-asparaginase: from screening to medium development. *Acta Sci., Biol. Sci.* 38: 387-394.
- Grigoropoulos, N. F., Petter, R., 'T Veer, M. B. V., Scott, M. A., Follows, G. A. 2013. Leukaemia update. Part 1: diagnosis and management. *BMJ Careers*. 346.
- Hosamani, R., and Kaliwal, B. B. 2011. Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti*. *I. J. M. R.* 3: 108-119.
- Lopes, A. M., Oliveira-Nascimento, L., Ribeiro, A., Tairum Jr, C. A., Breyer, C. A., Oliveira, M. A., Pessoa, A. 2015. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37: 82-99.
- Loureiro, C. B., Borges, K. S., Andrade, A. F., Tone, L. G., Said, S. 2012. Purification and Biochemical Characterization of Native and Pegylated form of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* and Evaluation of Its Antiproliferative Activity. *Adv. Microbiol.* 2: 138-145.
- Luhana, K. K., Dave, A. A., Patel, K. U. 2013. Production, Purification & Characterization of Extracellular L-asparaginase (Anti Cancerous Enzyme) from *Aspergillus niger*. *International Journal of Chemtech Applications*, 2: 14-25.
- Mahajan, R. V., Saran, S., Saxena, R. K. Srivastava, A. K. 2013. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 341: 122-126.
- Papanikolaou, S., and Aggelis, G. 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.* 2: 43-49.
- Rivaldi, J. D., Sarroub, B. F., Fiorilo, R., Silva, S. S. 2008. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 37.
- Shanthipriya, A., Koteswara, V. R., Ginisham, S., Reddy, S. M. 2015. Factors influencing L-asparaginase Production by Three Thermophilic Caprophilous Fungi. *Int. J. Pharma Sci.*, 5: 1242-1248.
- Vachhani, J. and Desai, B. 2018. Isolation, identification and production of L-asparaginase producing bacteria from soil. *BMR Microbiology*. 4: 1-6.
- Wakil, S. M., and Adelegan, A. A. 2015. Screening, production and optimization of L-asparaginase from soil bacteria isolated in Ibadan, South-western *Nigeria*. *Journal of Basic & Applied Sciences*. 11: 39-51.
- Zuo, S., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. 2015. Recent research progress on microbial L-asparaginases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 1069-1079.
